

Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
an der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. F. Körber

**KINETIK DES ALKALIIONENTRANSPORTS
BEI E. COLI B 163
UND SEINER K^+ -RETENTIONS MUTANTE B 525**

vorgelegt von
Marion Rikarda Haug
Stuttgart

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

1977

Aus: Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik an der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. F. Körber

Kinetik des Alkaliionentransports
bei E.coli B 163
und seiner K^+ -Retentionsmutante B 525

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marion Rikarda Haug
Stuttgart

Referent: Professor Dr. T. Günther
Korreferent: Professor Dr. K. Hierholzer



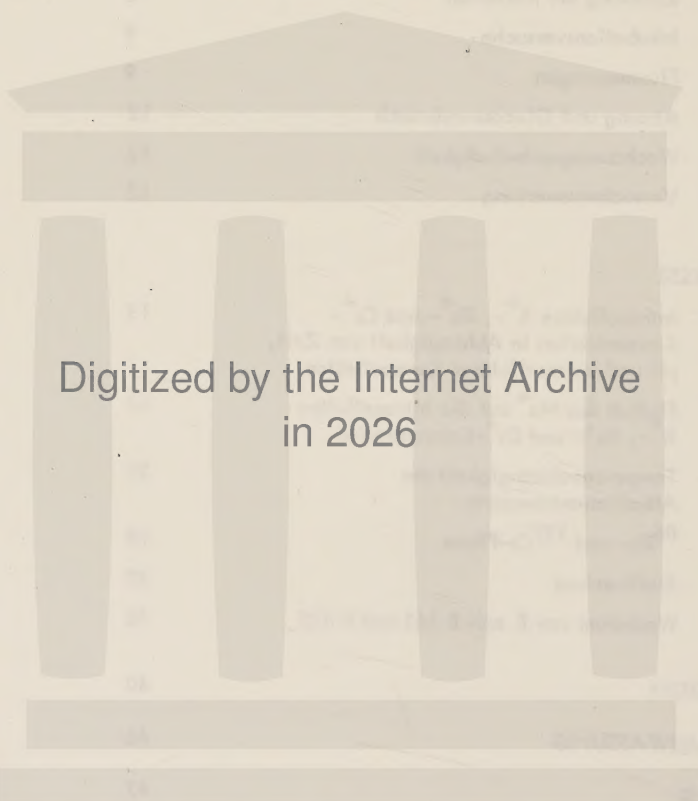
Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12. Januar 1977

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	
Züchtung der Bakterien	8
Inkubationsversuche	9
Fluxmessungen	9
Atmung und Glucoseverbrauch	12
Wachstumsgeschwindigkeit	12
Versuchsauswertung	12
ERGEBNISSE	
Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ - Konzentration in Abhängigkeit von Zeit, pH und extrazellulärer Konzentration	13
Einfluß des Na^+ auf die intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration	14
Temperaturabhängigkeit des Alkaliionentransports	25
^{86}Rb - und ^{137}Cs -Fluxe	29
Stoffwechsel	32
Wachstum von E.coli B 163 und B 525	38
DISKUSSION	40
ZUSAMMENFASSUNG	46
LITERATUR	47



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0028

EINLEITUNG

Die Zellmembran sorgt für die Aufrechterhaltung eines inneren Milieus, in welchem Stoffwechselvorgänge trotz einer sich ändernden Umwelt unter möglichst optimalen Bedingungen ablaufen können. Dies wird dadurch erreicht, daß die Membran eine Barriere gegen einen ungehinderten Stoffaustausch mit der Umgebung bildet. Sie scheidet Stoffwechselendprodukte aus und nimmt Stoffe, die in der Zelle für den Energiestoffwechsel, das Zellwachstum oder für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Ionenmilieus benötigt werden, auch gegen einen Konzentrationsgradienten auf.

Ein wichtiger Transportvorgang ist die Anreicherung von K^+ . Die meisten lebenden Zellen sind dazu in der Lage. Ausnahmen bilden die Erythrozyten von Hund und Katze (1, 2). Bei den Schafen haben nur 10 % der Tiere Erythrozyten mit hohem K^+ -Gehalt, die Erythrozyten der übrigen Schafe reichern nur wenig K^+ an. Die Eigenschaft, eine niedrige intrazelluläre K^+ -Konzentration zu erreichen, wird dominant vererbt (3). Die Fähigkeit K^+ zu akkumulieren ist also genetisch festgelegt.

Bei tierischen Zellen wird eine durch Na^+ und K^+ aktivierbare Membran-ATPase gefunden. Strophanthin macht diese Aktivierung wieder rückgängig und hemmt in der gleichen Konzentration auch den Na^+ - und K^+ -Transport in diesen Zellen (4). Erythrozyten von Hund und Katze, welche nur wenig K^+ anreichern können, haben auch keine durch Na^+ und K^+ aktivierbare Membran-ATPase (5). Die durch Na^+ und K^+ aktivierbare Membran-ATPase vermittelt den aktiven Na^+ und K^+ -Transport bei tierischen Zellen. Nach DAHL und HOKIN (6) erfährt dieses allosterische Enzym bei der ATP-Hydrolyse und durch gleichzeitige Bindung von Na^+ und K^+ eine Konformationsänderung, wodurch die Translokation von K^+ im Austausch gegen Na^+ durch die Membran bewirkt wird.

Bei Bakterien, die ebenfalls eine hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration aufweisen, hängt der aktive K^+ -Transport nicht in der gleichen Weise von der Membran-ATPase ab. So findet sich z.B. praktisch kein Unterschied der Aktivitäten der Membran-ATPase von E.coli B 163 und B 525, obwohl die Mutante B 525 gegenüber dem Wildtyp B 163 eine deutliche Veränderung in der Fähigkeit K^+ anzureichern aufweist (7, 8). Die Membran-ATPase wird durch Na^+ nur wenig und durch K^+ überhaupt

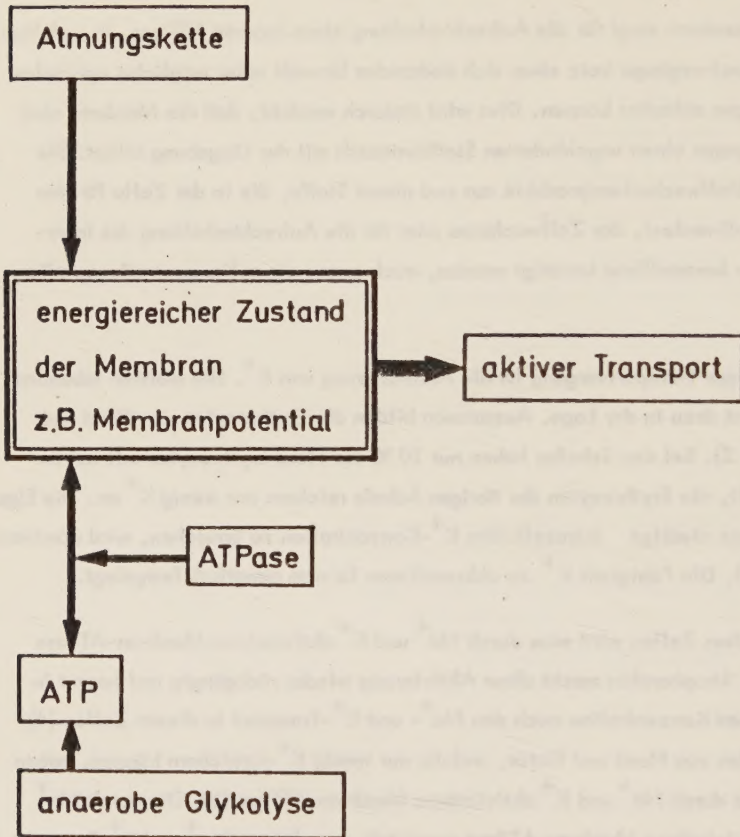
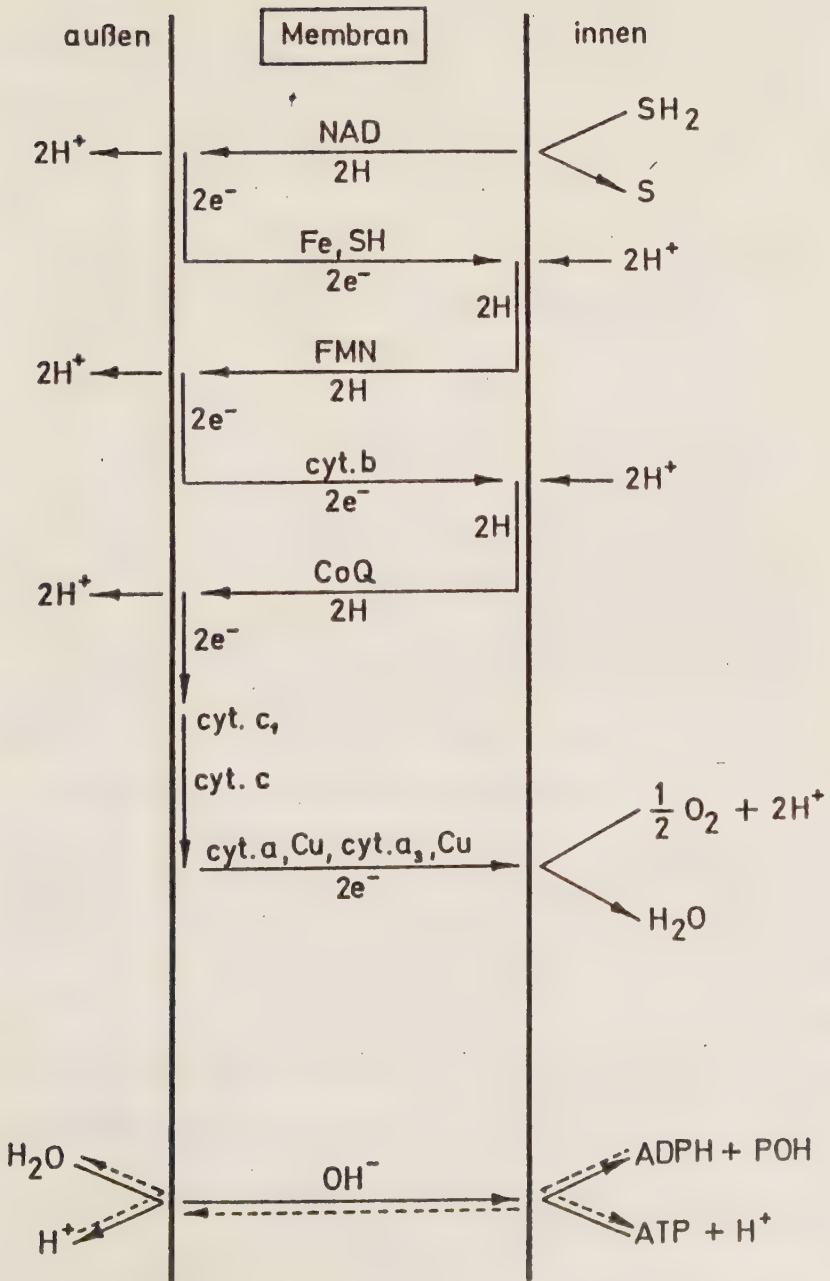


Abb. 1: Schematische Darstellung der Koppelung von Energiestoffwechsel und aktivem Transport, Erläuterungen s. Text

Abb. 2 (nächste Seite):

Elektronentransport in der Atmungskette (oben) und ATP-Hydrolyse (—) bzw. ATP-Synthese (----) nach MITCHELL (13)



nicht aktiviert und durch Strophantin nicht gehemmt. Durch Zugabe von Antiseren gegen eine ATPase-Präparation (Anti-ATPase) wird zwar die Aktivität der Membran-ATPase von *E.coli* bis zu 80 % gehemmt, jedoch werden unter aeroben Bedingungen der aktive K^+ -Transport, der $^{42}K^+$ -turnover sowie Atmung und Glucoseverbrauch dadurch nicht beeinflusst (9). Bei Bakterien muß also eine andere Verknüpfung des aktiven Alkaliionentransports mit dem Energiestoffwechsel vorliegen.

Der aktive Alkaliionentransport bei Bakterien ist aber ebenfalls vom Energiestoffwechsel abhängig. Wird dieser Energiestoffwechsel gestört (z.B. durch Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung), so sind die Zellen nicht mehr in der Lage, K^+ anzureichern. Die untersuchten *E.coli* sind fakultative Anaerobier; sie können also die für den aktiven Transport erforderliche Energie unter aeroben Bedingungen aus der Atmungskette oder unter Sauerstoffabschluß aus der anaeroben Glykolyse gewinnen. Die Koppelung des Energiestoffwechsels mit dem aktiven Transport ist gemäß den heutigen Vorstellungen (10, 11, 12) in Abb. 1 schematisch dargestellt. Danach wird unter aeroben Bedingungen über die Atmungskette und unter anaeroben Bedingungen via Glykolyse - ATP - ATPase ein energiereicher Zustand der Membran (wahrscheinlich ein Membranpotential und/oder ein pH-Gradient) geschaffen, wodurch K^+ in der Zelle angereichert wird. In der Atmungskette werden Elektronenpaare transportiert und auf $1/2 O_2$ übertragen. Eine Darstellung dieses Vorgangs sowie die Entstehung des Membranpotentials und des pH-Gradienten bei der Spaltung von glykolytisch entstandenem ATP findet sich in Abb. 2 (nach MITCHELL, 13).

Danach werden durch den Transport von einem Elektronenpaar durch die Atmungskette insgesamt $6 H^+$ von der einen Seite der Membran (innen) auf die andere (außen) gebracht. Dadurch kommt es an der Membran zu einem pH-Gradienten und zu einer Ladungstrennung und damit zu einem Membranpotential.

Unter O_2 -Abschluß oder Hemmung der Atmung durch CN^- wird glykolytisch entstandenes ATP mittels der in der Membran lokalisierten ATPase hydrolytisch gespalten. Nach der chemiosmotischen Hypothese von MITCHELL (13) wird auch hier wieder auf der einen Seite der Membran H^+ verbraucht (innen), während es auf der anderen Seite entsteht (außen). Dies führt eben wieder zu einem pH-Gradienten und zu einem Membranpotential (Abb. 2 unten, durchgezogene Linie).

Membranpotential und pH-Gradient können nur dann bestehen bleiben, wenn die Lipidmembran für H^+ schwer permeabel ist. Damit aber würde nach kurzer Zeit an der Membran ein zu hoher pH-Gradient und ein zu hohes Membranpotential entstehen, Atmungskette und/oder ATP-Hydrolyse kämen zum Erliegen und die Zelle könnte keine Energie mehr gewinnen. H^+ muß also durch die Membran wieder zurück ins Zellinnere gelangen können. Dies ist auf vier Wegen möglich (nach MITCHELL, 13):

1. durch passive Diffusion
2. durch Umkehrung der ATP-Hydrolyse mittels des reversiblen ATPase-Systems (Abb. 2 unten, gestrichelte Linie)
3. durch einen Kationen/ H^+ -Antiporter
4. durch einen Anionen/ H^+ -Symporter

Die passive Diffusion muß unter normalen Bedingungen gering sein, da sonst pH-Gradient und Membranpotential zusammenbrechen. Sie wird aber beispielsweise durch 2,4 Dinitrophenol (DNP) ermöglicht, welches als schwache Säure mit einem ausgeprägten π -Elektronensystem ein idealer H^+ -Konduktor ist (14). In Gegenwart von 2,4 DNP kann weder über die Atmungskette noch über die Spaltung von glykolytisch entstandenem ATP ein energiereicher Zustand der Membran geschaffen werden, und die Zelle ist demzufolge nicht in der Lage K^+ anzureichern.

Die zweite Möglichkeit für H^+ in die Zelle zurückzugelangen ist die Umkehrung der ATP-Hydrolyse mittels des reversiblen ATPase-Systems (Abb. 2 unten, gestrichelte Linie). Auch hierbei wird der energiereiche Zustand der Membran aufgehoben, jedoch steht nun der Zelle die Energie in Form des ATP zur Verfügung. Wenn das ATP nun seinerseits die Energiequelle für den aktiven Transport von K^+ sein sollte, so würde man in der Membran eine ATPase erwarten, deren Hemmung zu einer Beeinträchtigung der K^+ -Anreicherung führen müßte. Dies ist bei E.coli unter aeroben Bedingungen nicht der Fall (9). Im Gegensatz dazu ist die Membran-ATPase von E.coli unter O_2 -Abschluß oder Hemmung der Atmung mit CN^- unerläßlich für die K^+ -Akkumulation, da sie nun glykolytisch entstandenes ATP spaltet und damit den für den aktiven Transport erforderlichen energiereichen Zustand der Membran schafft. Im Einklang mit dieser Vorstellung transportiert eine von BUTLIN et al. (15) isolierte ATPase-Mutante von E.coli K mit der Bezeichnung AN 120 unter anaeroben

Bedingungen wesentlich weniger K^+ als B 163 mit normaler ATPase-Aktivität (16). Für den aktiven Transport ist also der energiereiche Zustand der Membran maßgebend, gleichgültig ob dieser über die Atmungskette oder über die Hydrolyse von glykolytisch gebildetem ATP geschaffen wurde.

Die dritte und vierte Möglichkeit für H^+ in die Zelle zurückzugelangen, ist entweder über einen Antiporter im Austausch gegen Kationen in der Regel Na^+ oder über einen Symporter zusammen mit Anionen beispielsweise Aminosäuren. Im Gegensatz zu den ersten beiden Möglichkeiten wird in diesem Fall nur der pH-Gradient abgebaut, während das Membranpotential erhalten bleibt. Auf die Dauer gesehen ist dies unerlässlich, da zum Aufbau des energiereichen Zustands der Membran ständig H^+ von innen nach außen transportiert wird. Durch den selektiven Abbau des pH-Gradienten kann nun der Energiestoffwechsel ungehindert ablaufen und das Membranpotential kann seinerseits aktive Transportaufgaben wie die Akkumulation von K^+ betreiben.

Die intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration ergibt sich aus dem K^+ -Influx und dem K^+ -Efflux. Beide erfolgen durch die Zellmembran wahrscheinlich mittels Carrier, über deren Struktur bislang nichts bekannt ist. Es mag erstaunlich sein, daß auch der K^+ -Efflux durch Carrier bedingt sein soll, da man bei einer so hohen K^+ -Anhäufung in der Zelle gegenüber dem Medium eher eine passive Diffusion entlang dem Konzentrationsgradienten erwarten würde. EPSTEIN und SCHULTZ (29) konnten aber bei *E. coli* nachweisen, daß in gewissem Umfange die Abnahme des Influx (z.B. durch eine erniedrigte extrazelluläre K^+ -Konzentration oder durch Zugabe von 2,4 DNP bis zu einer Konzentration von $2,7 \times 10^{-4}$ M zum Inkubationsmedium) durch eine gleichgroße Abnahme des K^+ -Efflux kompensiert werden kann, und die intrazelluläre K^+ -Konzentration somit unverändert bleibt. Ein solches Verhalten ist durch passive Diffusion nicht zu erklären. EPSTEIN und SCHULTZ schlossen daraus auf die Existenz eines Effluxcarriers für K^+ , der regulatorische Funktionen übernehmen könnte.

Zur Charakterisierung des Transportmechanismus werden Mutanten gezüchtet, bei denen die Fähigkeit, K^+ zu akkumulieren, stark eingeschränkt ist. Durch vergleichende Untersuchungen mit den Wildtypeltern lassen sich die Veränderungen präzisieren und man kann dann Rückschlüsse auf den Transportvorgang ziehen.

Prinzipiell sind zwei Arten von K^+ -Mangelmutanten möglich, nämlich Aufnahmemutanten mit gestörtem Influx (17, 18, 19) oder Retentionsmutanten mit einem übersteigerten Efflux (20).

EPSTEIN et al. (21, 22) konnten insgesamt 9 Gene bei E.coli K nachweisen, die alle den K^+ -Haushalt beeinflussen: 4 Kdp-Gene (K^+ -dependent) und die TrK-Gene A bis E (Transport of K^+). Kdp⁻-Mutanten wachsen im Gegensatz zum Wildtyp nicht in Medien mit geringem K^+ -Gehalt, sie erreichen aber etwa die gleiche intrazelluläre K^+ -Konzentration wie der Wildtyp aber offensichtlich wesentlich langsamer. Ist nur ein TrK-Gen mutiert, so tritt keine Störung des K^+ -Haushaltes auf, so daß sich diese Mutanten praktisch nicht isolieren lassen. Erst wenn Kdp⁻-Eltern der Mutagenese ausgesetzt werden, können Kdp⁻/TrK⁻-Mutanten entstehen, die nun auch eine erhebliche Veränderung der K^+ -Akkumulation aufweisen (21). Nach EPSTEIN und KIM sollen dabei mutierte TrK-Gene A, D und E mit einem verminderten Influx, mutierte TrK-Gene B und C mit einem erhöhten Efflux von K^+ einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Transport bei den E.coli-Stämmen B 163 und B 525 untersucht. Die von LUBIN und KESSEL (23) aus B 163 isolierte K^+ -Mangelmutante B 525 weist gegenüber dem Wildtyp eine Veränderung am ringförmigen Bakterienchromosom in der Nähe des Leucin-Markers auf. Diese ist wahrscheinlich identisch mit dem ebenfalls in der Nähe liegenden TrK C-Gen. Phänotypisch sollte man also nach EPSTEIN und KIM (21) eine Mutante mit einem erhöhten Efflux, eine Retentionsmutante erwarten. Die folgenden Untersuchungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob B 525 tatsächlich eine Retentionsmutante ist. Durch Einbeziehung von Rb^+ und Cs^+ (Alkalikationen mit größerem Radius und daher kleineren Ladungsdichte an der Oberfläche, kleinerer Hydrathülle und größerer Beweglichkeit) anstelle des K^+ sollte der Austrittsmechanismus charakterisiert werden. Die Auswirkungen der Mutation wurden dadurch deutlicher und es wurden sogar Bedingungen gefunden, unter denen die Mutante B 525 mehr K^+ , Rb^+ und Cs^+ akkumuliert als der Wildtyp B 163.

MATERIAL UND METHODEN

Für die Versuche wurden die von LUBIN et al. (23) isolierte K^+ -Mangelmutante B 525 und ihr Wildtyp B 163 verwendet. Für beide Stämme sind die Aminosäuren Histidin, Leucin und Methionin essentiell. Darüberhinaus benötigt B 525 für das Wachstum eine erhöhte K^+ -Konzentration. Die Bakterien wurden uns von ZIMMERMANN (Kernforschungsanlage Jülich) steril auf Schrägagar verimpft zugeschickt und für die Versuche bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt.

Die Bakterien wurden vom Schrägagar auf das Nährmedium überimpft und über Nacht bei $37^{\circ}C$ mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 mittels Glasfritten begast. Das Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung:

	(mM)
NaCl	80
KCl	30
$MgCl_2$	1
$(NH_4)_2SO_4$	10
NH_4Cl	15
K_2HPO_4	30
KH_2PO_4	30
Glucose	0,75 %
L-Leucin	100 $\mu g/ml$ Medium
L-Histidin	100 $\mu g/ml$ Medium
L-Methionin	100 $\mu g/ml$ Medium

Die über Nacht gewachsenen Bakterien wurden vor dem Versuch in der Servall-Zentrifuge bei 10 000 g vom Nährmedium abzentrifugiert und mit bidestilliertem Wasser einmal auf der Zentrifuge gewaschen.

Inkubationsversuche

Die Inkubation erfolgte aerob unter Schütteln in einem offenen Erlenmeyerkolben in 20 ml Inkubationsmedium, welches 0,1 M Tris-Phosphat-Puffer (mit dem entsprechenden pH), 1 mM MgCl_2 , 0,5 % Glucose, 0,1 M NaCl und 10 ml KCl, RbCl oder CsCl enthielt. Die Inkubationszeiten betrugen bei Versuchen mit K^+ 10 min, mit Rb^+ 30 min und mit Cs^+ 120 min. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen bei 10 000 g abzentrifugiert und anschließend das Feuchtgewicht der Bakterien ermittelt, die dann im Vakuumtrockenschrank bei 80°C und 1 Torr getrocknet wurden. Aus dem Trocken- und Feuchtgewicht wurde der Wassergehalt bestimmt. Die Trockensubstanz wurde in Duran-Gläser eingewogen und mit 0,2 ml 10 N HNO_3 eine Stunde bei 100°C digeriert. Nach Zugabe von bidestilliertem Wasser wurde der Alkalionengehalt flammenphotometrisch bestimmt. Unter Berücksichtigung des Extrazellulärraumes zwischen den sedimentierten Zellen wurde die intrazelluläre K^+ , Rb^+ , Cs^+ und Na^+ -Konzentration errechnet (8).

Fluxmessungen

Zur Bestimmung der ^{86}Rb - bzw. ^{137}Cs -Fluxe wurden die Zellen mit 5 mM Rb^+ bzw. Cs^+ bis zum Erreichen der Steady-state-Verteilung vorinkubiert. Anschließend wurden 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{86}Rb bzw. ^{137}Cs zugesetzt. Sofort nach dem Mischen und nach 2, 7, 15, 30, 60, 90, 120 und 150 min wurde je 1 ml der Zellsuspension durch einen Sartorius-Membranfilter gesaugt (Durchmesser 25 mm, Porengröße 0,45 μ), der zuvor mit 1 ml eiskalter 5 mM RbCl- bzw. CsCl-Lösung vorgespült worden war, um die Absorption von extrazellulärem ^{86}Rb bzw. ^{137}Cs im Filter zu verringern. Anschließend wurde mit 2 ml eiskaltem Medium frei von Glucose und frei von Rb^+ bzw. Cs^+ nachgespült, um extrazelluläres ^{86}Rb bzw. ^{137}Cs zwischen den Zellen zu entfernen. Die Radioaktivität (IpM) der Filter wurden dann mit einem Plastik- β -Scintillationszähler in einem Probenwechsler mit dem Strahlungsmeßgerät FH 49 c (Fa. Frieske und Berthold) gezählt und gegen die Zeit aufgetragen. Ein typischer Kurvenverlauf findet sich in Abb. 3. Die Influx- und Effluxkonstanten wurden nach SLAYMAN und TATUM (30) ermittelt:

$$\ln(1 - x_B/x) = -(k_{\text{infl.}} + k_{\text{effl.}}) \cdot t$$

wobei x_B = IpM in den Bakterien zur Zeit t der Abnahme
 x = IpM in den Bakterien für $t = \infty$
 $k_{\text{infl.}}$ = Geschwindigkeitskonstante für den Influx (min^{-1})
 $k_{\text{effl.}}$ = Geschwindigkeitskonstante für den Efflux (min^{-1})

Nach Subtraktion von x_0 wird der Quotient x_B/x ermittelt. Die Differenz $1 - x_B/x$ wird halblogarithmisch (zur Basis 10) gegen die Zeit aufgetragen, wobei man eine Gerade erhält. Da

$$\ln a = 2,3 \log a$$

hat diese Gerade die Steigung

$$-1/2,3 (k_{\text{infl.}} + k_{\text{effl.}})$$

Im Gleichgewichtszustand ist der Influx gleich dem Efflux. Influx und Efflux ergeben sich aus folgenden Formeln

$$\text{Influx} = k_{\text{infl.}} \cdot S_A \qquad \text{Efflux} = k_{\text{effl.}} \cdot S_B$$

wobei S_A die Substanzmenge im Medium, S_B die Substanzmenge in den Bakterien ist. Für Steady-state-Bedingungen gilt schließlich

$$k_{\text{infl.}} = \frac{S_B}{S_A + S_B} (k_{\text{infl.}} + k_{\text{effl.}})$$

$$k_{\text{effl.}} = \frac{S_A}{S_A + S_B} (k_{\text{infl.}} + k_{\text{effl.}})$$

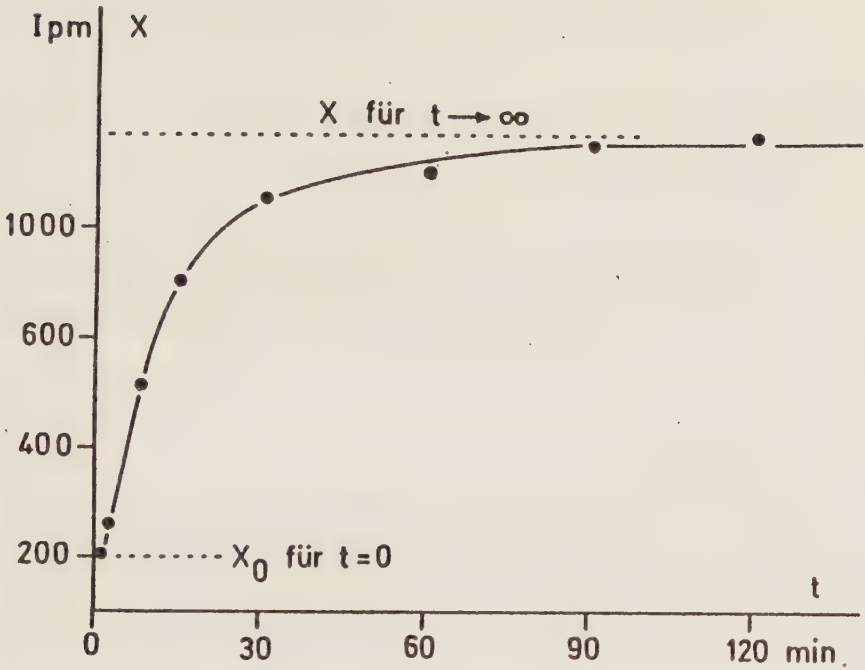


Abb. 3: Beispiel einer Fluxkurve (Erläuterungen s. Text)

Atmung und Glucoseverbrauch

Die Atmung wurde unter den gleichen Bedingungen wie der Transport manometrisch mit dem Warburg-Apparat gemessen. Hierbei wird in einem geschlossenen System von den Bakterien O_2 verbraucht. Das abgeatmete CO_2 wird in einem vom Versuchsansatz getrennten Gefäß durch KOH gebunden, wodurch ein Unterdruck entsteht. Die Druckänderungen wurden gemessen und daraus der jeweilige O_2 -Verbrauch bestimmt.

Die Glykolyse wurde aus dem Glucoseverbrauch ermittelt. Die Glucosebestimmungen wurden enzymatisch mit Glucoseoxidase (Blutzuckertest Boehringer Mannheim) ausgeführt. Der Proteingehalt wurde nach LOWRY et al. ermittelt (43).

Wachstumsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit (Verdoppelungen/Stunde) wurden die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium (s.o.) bei 37° geschüttelt und die Zunahme der Extinktion bei 405 nm gemessen. Das Wachstumsmedium enthielt anstelle von K-Phosphat Na-Phosphat des entsprechenden pH-Wertes und verschiedene Konzentrationen von KCl.

Versuchsauswertung

Jeder Versuch wurde mindestens zweimal, in der Regel dreimal durchgeführt, wobei innerhalb eines Versuchs jeder Meßwert doppelt bestimmt wurde. Aus den vorliegenden Werten wurde das arithmetische Mittel errechnet. Die Standardabweichung s wurde nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X)^2}{n}}$$

ermittelt, wobei

- $\bar{X}$ = arithmetisches Mittel der Meßwerte
- X = Meßwert
- n = Anzahl der Meßwerte

ist.

ERGEBNISSE

Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen in Abhängigkeit von Zeit, pH und extrazellulärer Konzentration

Um die Versuchsbedingungen festzulegen, wurde die Zeit ermittelt, nach der die Gleichgewichtskonzentrationen erreicht sind. Bei pH 7,5 und 37° C sind diese Steady-state-Konzentrationen bei B 163 und B 525 mit K^+ nach 10 min, mit Rb^+ nach 30 min und mit Cs^+ nach 120 min erreicht (Abb. 4). Bei pH 4,0 und 37° C stellen sich die Steady-state-Konzentrationen nach den gleichen Zeiten, bei pH 7,5 und 50° C sogar etwas früher ein (nicht dargestellt).

Die Bildung des für den aktiven Transport erforderlichen Membranpotentials ist mit der Bildung eines pH-Gradienten eng verknüpft. H^+ soll nach den Vorstellungen von ARMSTRONG und ROTHSTEIN (24, 25) außerdem mit den Alkaliionen um den transportierenden Carrier-Site konkurrieren oder durch allosterische Effekte die Transporteigenschaften des Carriers verändern können. HAROLD et al. (26) isolierte eine Strept. faecalis-Mutante 325 B bzw. 687 A, deren erniedrigte K^+ -Anreicherung zunächst als Folge eines erhöhten K^+ -Efflux erklärt wurde; später wurde ein defekter K^+/H^+ -Transport für den geringen K^+ -Gehalt verantwortlich gemacht (27, 28). Deshalb wurde bei B 163 und B 525 der Einfluß des extrazellulären pH auf die intrazellulären Gleichgewichtskonzentrationen von K^+ , Rb^+ und Cs^+ untersucht (Abb. 5). Das pH-Optimum ist bei der Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich in den sauren Bereich verschoben. So kommt es, daß unterhalb eines bestimmten pH-Wertes die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen von B 525 höher sind als die von B 163. Dieser pH-Wert liegt für K^+ bei 3,7, für Rb^+ bei 4,0 und für Cs^+ bei 4,6. Durch dieses Verhalten unterscheidet sich B 525 wesentlich von der Strept. faecalis-Mutante 325 B bzw. 687 A. Letztere akkumuliert gerade im sauren Bereich unter pH 6 weniger K^+ als der Wildtyp, während bei höherem pH der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante aufgehoben ist.

GÜNTHER und DORN haben früher den K^+ -Gehalt von B 163 und B 525 in Abhängigkeit von der extrazellulären K^+ -Konzentration untersucht (8). Durch die Einbeziehung von Rb^+ und Cs^+ sieht man, daß bei Wildtyp und Mutante die Alkaliionenanreicherung in der Reihenfolge $K^+ > Rb^+ > Cs^+$ erfolgt. Bei beiden Stämmen wird also K^+ am

besten und Cs^+ am schlechtesten akkumuliert. Wie schon früher gezeigt wurde (8), reichert B 525 bei niedrigen extrazellulären K^+ -Konzentrationen wesentlich weniger K^+ an, während mit zunehmender extrazellulärer Konzentration der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante mehr und mehr verschwindet und bei 100 mM K^+ praktisch aufgehoben ist (8). Diese Tendenz der Annäherung bei hohen Konzentrationen ist auch mit Rb^+ und Cs^+ zu beobachten (Abb. 6 a).

Bei pH 4,0 sind die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen der Mutante höher als die des Wildtyps und auch höher als bei pH 7,5 (Abb. 6 b). Dies ist in Einklang mit der oben beschriebenen Verschiebung des pH-Optimums der Steady-state-Konzentrationen von B 525 in den sauren Bereich und der daraus folgenden besseren K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Akkumulation als bei B 163 unterhalb bestimmter pH-Werte.

Einfluß des Na^+ auf die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen

Von den erwähnten Ausnahmen abgesehen, wird K^+ gegen einen Konzentrationsgradienten intrazellulär angereichert, während der Na^+ -Gehalt normaler Zellen auch bei hoher extrazellulärer Na^+ -Konzentration niedrig ist. Extrazelluläres Na^+ beeinflusst aber den K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Gehalt von B 163 und B 525. Bei pH 7,5 wird die intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration von B 163 durch 100 mM Na^+ im Inkubationsmedium sowohl bei niedriger (Abb. 7 a) als auch bei hoher (Tab. 1) extrazellulärer K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration erhöht. Hier handelt es sich um die von EPSTEIN und SCHULTZ beschriebene Osmoregulation des K^+ -Gehalts (29). Danach wird bei hoher Osmolarität des Mediums mehr K^+ in die Zelle aufgenommen, wodurch ein Schrumpfen des Bakteriums verhindert wird, welches die Gefahr der Ablösung von der starren Zellwand (Plasmolyse) in sich birgt. Der gleiche Effekt wird durch 200 mM Rohrzucker (gleiche Osmolarität wie 100 mM dissoziiertes NaCl) erreicht. Bei pH 4,0 senkt Na^+ den K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Gehalt von B 163 (Abb. 7 a, Tab. 1).

Bei der Mutante ist die Wirkung des Na^+ auf die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen besonders bei niedriger extrazellulärer Konzentration entgegengesetzt. Während bei B 163 der K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Gehalt durch 100 mM Na^+ bei pH 7,5 erhöht wird, wird er bei der Mutante gesenkt (Abb. 7 a). Trotzdem muß aber auch bei der Mutante die von EPSTEIN und SCHULTZ beschriebene Osmoregulation wirksam sein,

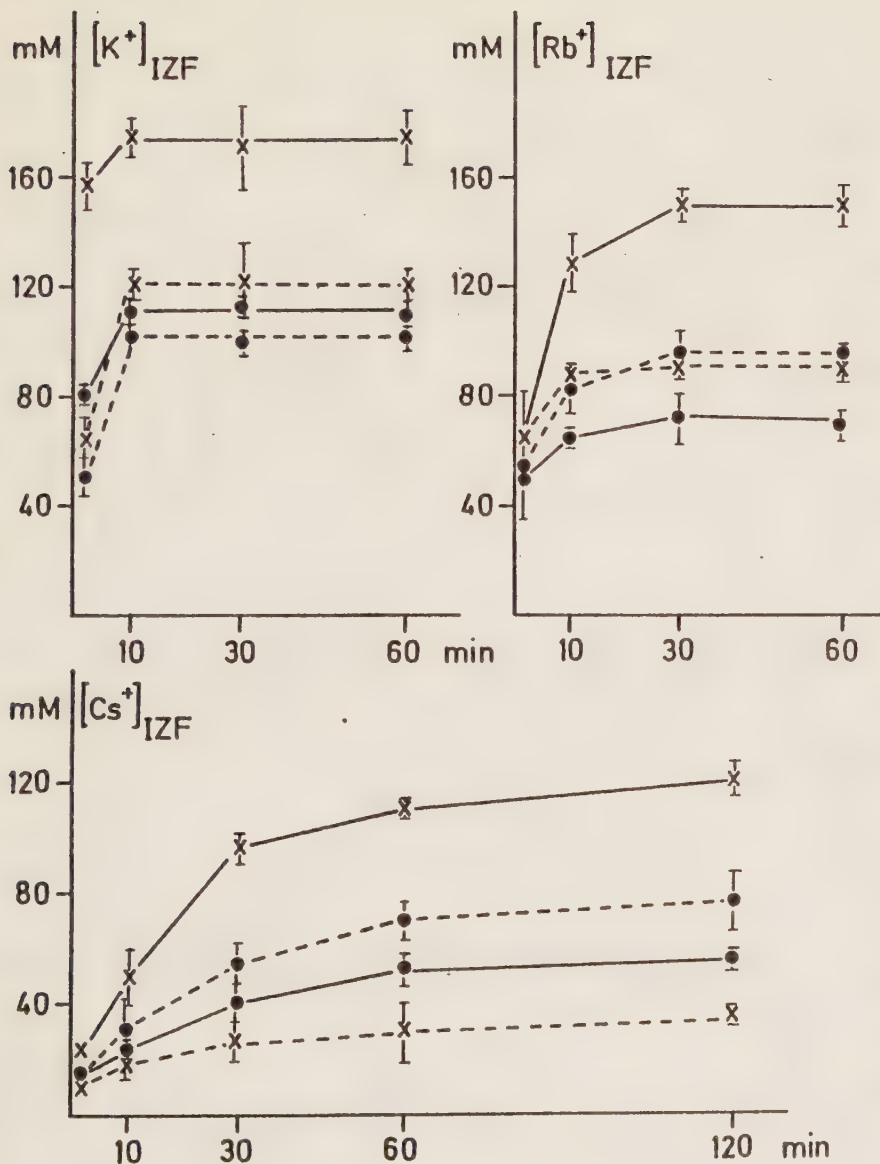
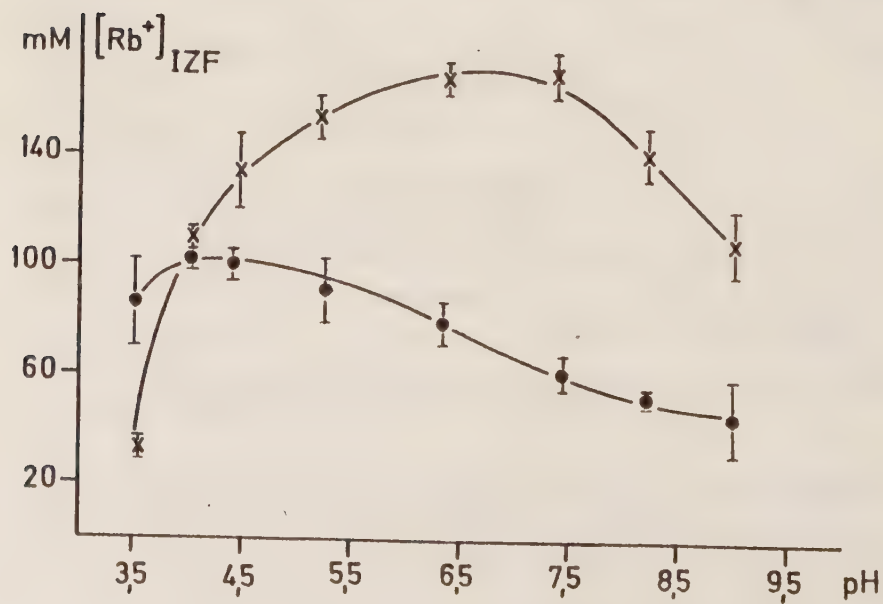
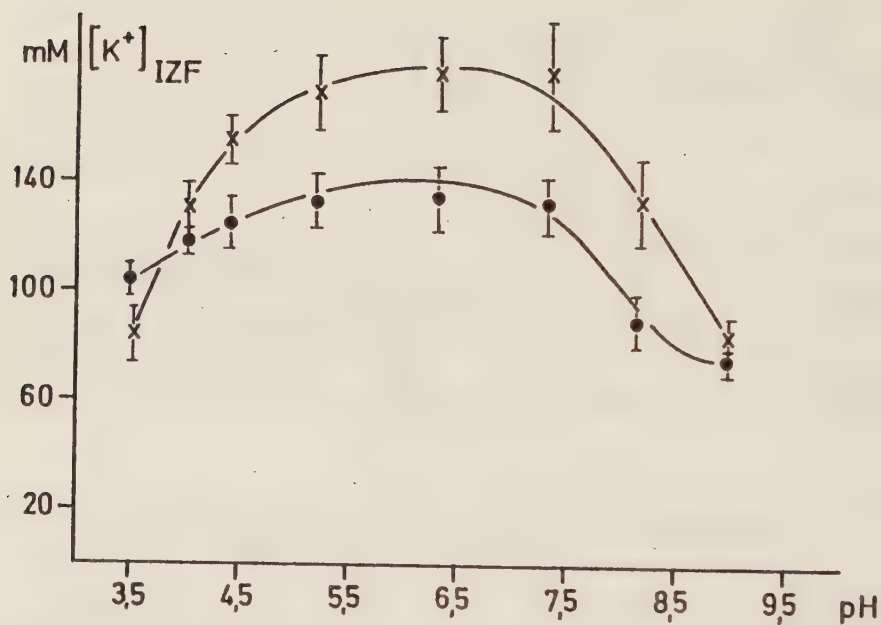


Abb. 4: Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit. — = pH 7,5 , ---- = pH 4,0 , x = B 163 , • = B 325



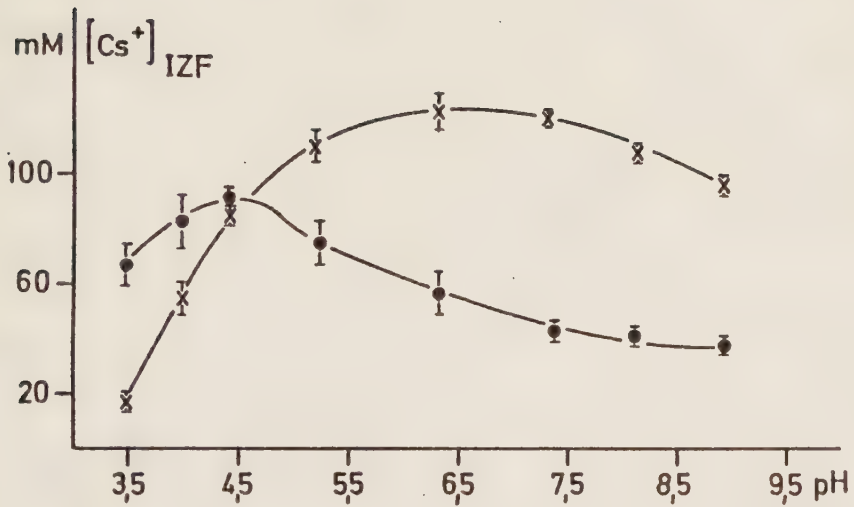
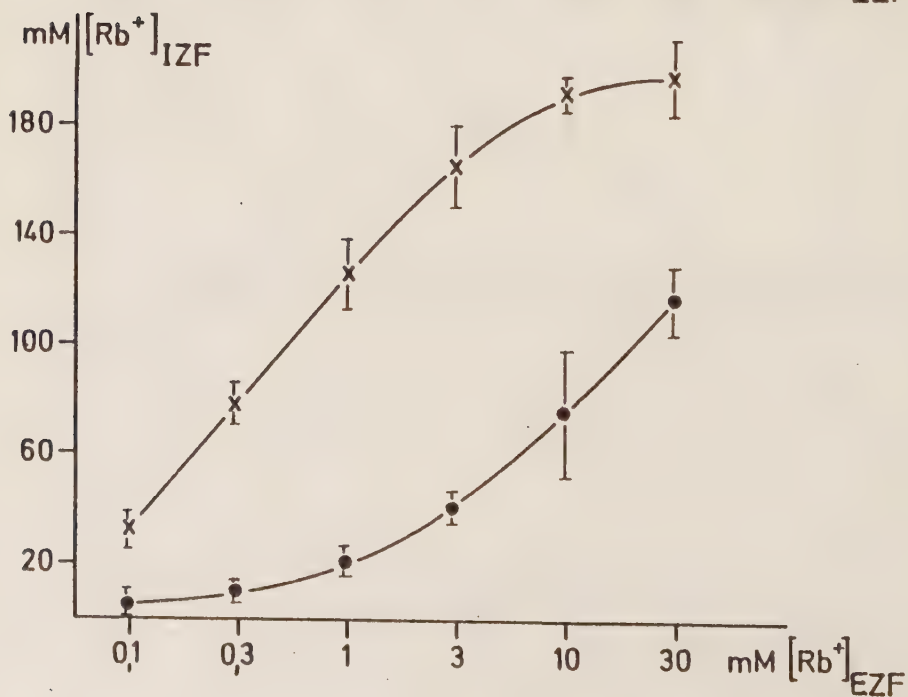
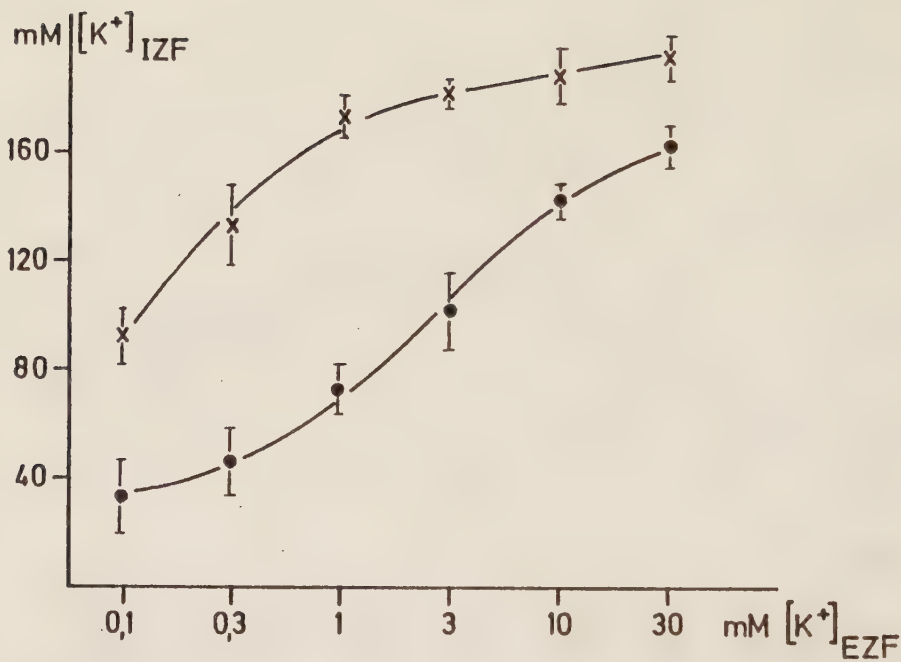


Abb. 5: Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH. x = B 163 • = B 525



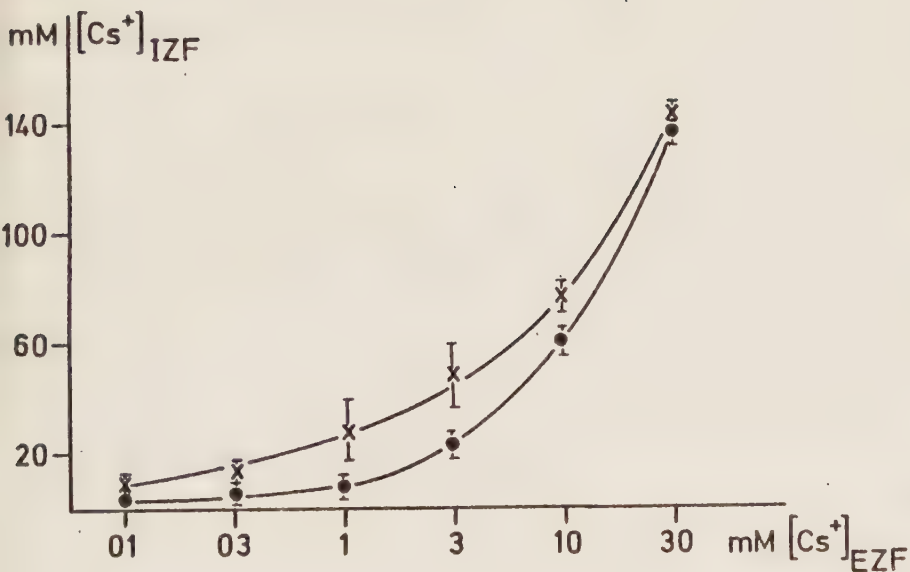
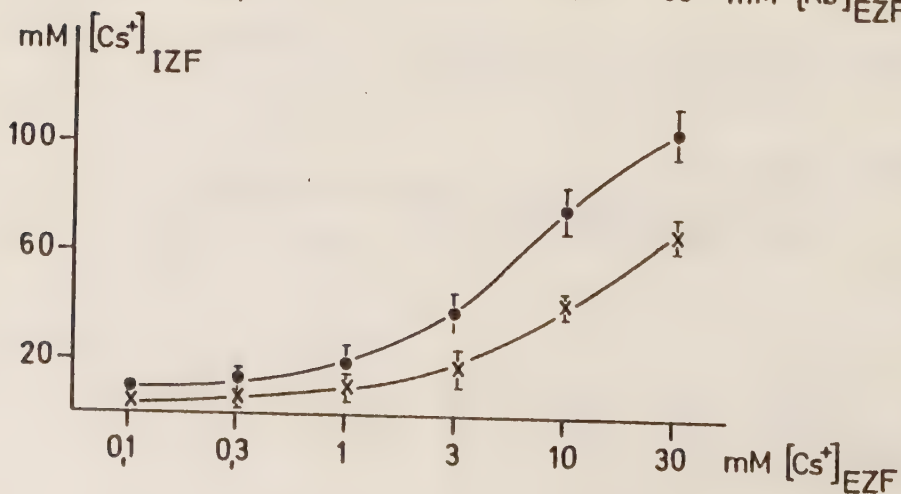
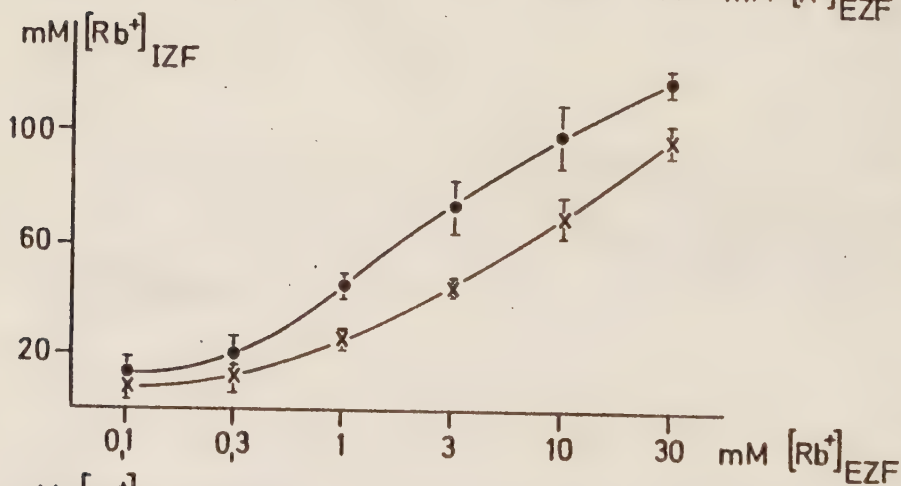
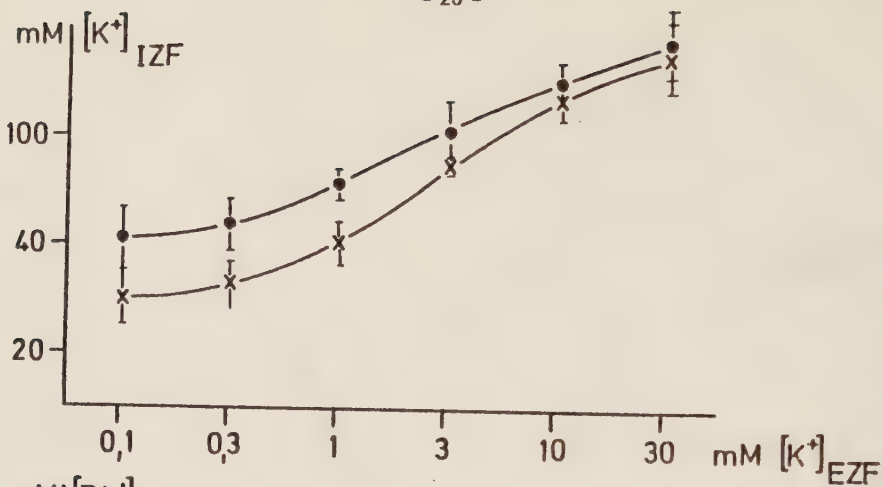


Abb. 6 a: Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration.
Tris- PO_4 -Medium pH 7,5 . x = B 163 , • = B 525

Abb. 6 b: (nächste Seite)
Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration.
Tris- PO_4 -Medium pH 4,0 . x = B 163 , • = B 525



denn 200 mM Rohrzucker, der im Gegensatz zum Na^+ nicht in die Zelle eindringen kann, steigert bei pH 7,5 wie schon bei Wildtyp die intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration von B 525 (Tab. 1). Daneben muß aber noch ein zweiter, später zu beschreibender Effekt zur Geltung kommen, der den Einfluß des Na^+ bei der Mutante erklärt. Dieser Einfluß ist bei pH 4,0 aufgehoben (Abb. 7 a, Tab. 1).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die intrazelluläre Na^+ -Konzentration von B 163 und B 525. Bei B 163 ändert sie sich über den gesamten pH-Bereich nur wenig (Abb. 7 b), während die K^+ - und Rb^+ -Konzentration die typische glockenförmige pH-Abhängigkeit zeigen (Abb. 7 a). Bei B 525 dagegen zeigt die intrazelluläre Na^+ -Konzentration bei der niedrigen extrazellulären K^+ - und Rb^+ -Konzentration von 0,3 mM große Ähnlichkeit mit der K^+ und Rb^+ -Kurve des Wildtyps, während die intrazelluläre K^+ - bzw. Rb^+ -Konzentration in diesem pH-Bereich wie die Na^+ -Kurve des Wildtyps verläuft (Abb. 7 a und 7 b). Das umgekehrte Verhalten des intrazellulären K^+ -Gehalts auf der einen und des Na^+ -Gehalts auf der anderen Seite, wurde schon von GÜNTHER und DORN beschrieben (8).

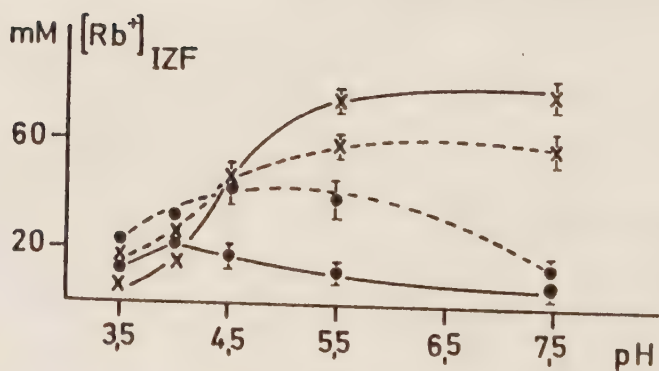
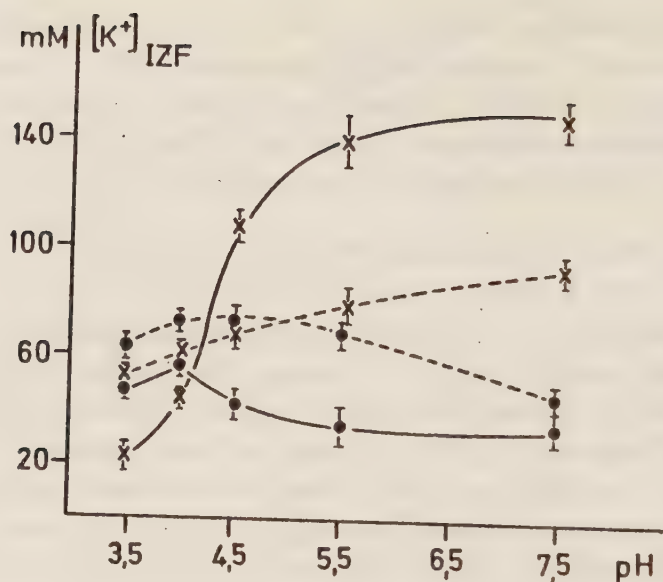


Abb. 7 a: Einfluß des Na^+ auf die intrazelluläre K^+ - und Rb^+ -Konzentration in Abhängigkeit vom pH. — = mit 100 mM Na^+ ---- = $\emptyset$ Na^+ . Die extrazelluläre K^+ - bzw. Rb^+ -Konzentration betrug 0,5 mM statt 10 mM. x = B 163, • = B 525

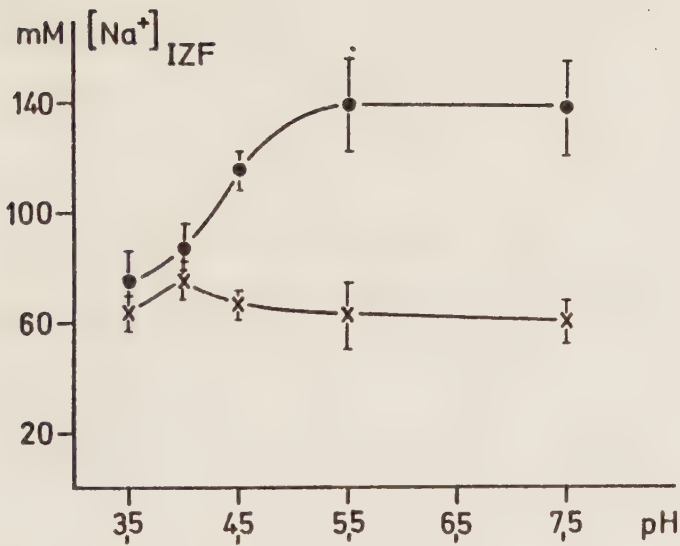


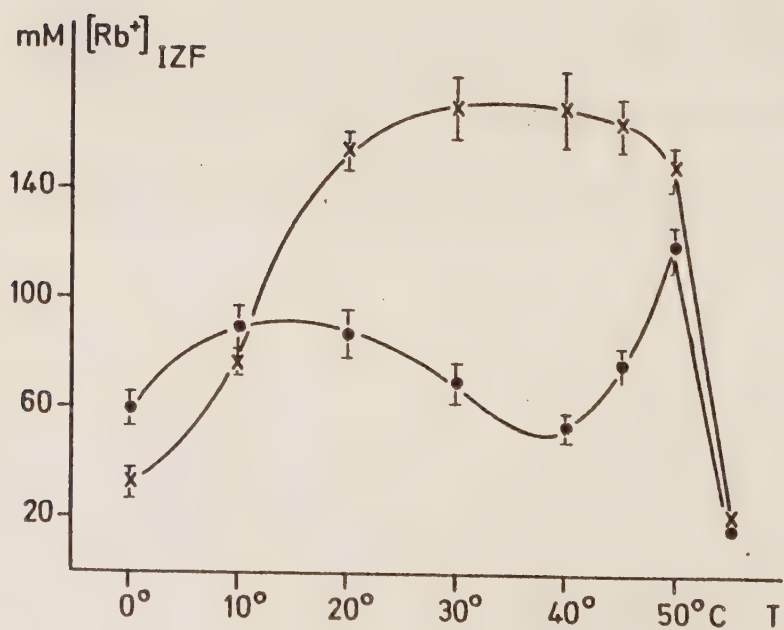
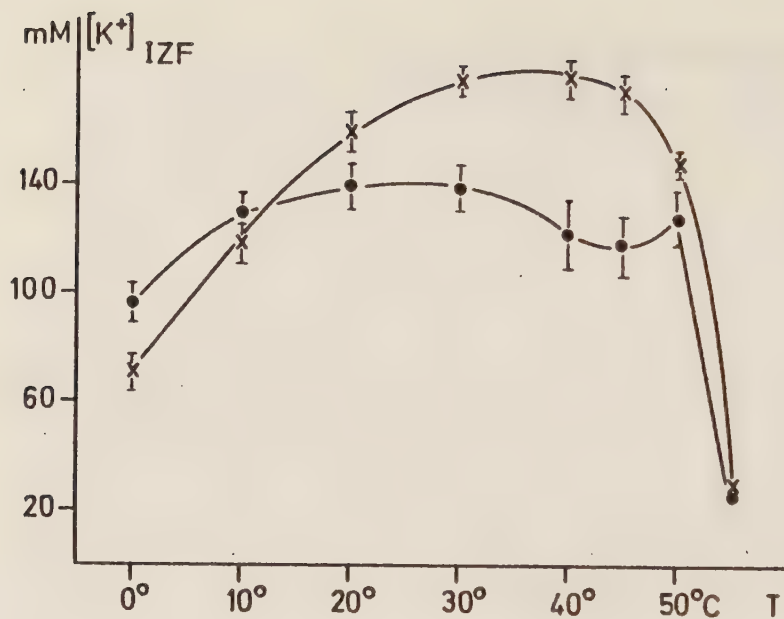
Abb. 7 b: Intrazelluläre Na^+ -Konzentration in Abhängigkeit vom pH.
Gleicher Versuch wie in Abb. 7 a. x = B 163 • = B 525

Tab. 1: Einfluß von 100 mM NaCl und 200 mM Rohrzucker auf die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen von B 163 und B 525. Die extrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration betrug jeweils 10 mM. RZ = Rohrzucker

	B 163			B 525		
	K^+	Rb^+	Cs^+	K^+	Rb^+	Cs^+
<u>pH 4,0</u>	(mM)			(mM)		
ohne Na^+	$67 \pm 2,5$	$67 \pm 6,3$	$39 \pm 3,8$	$94 \pm 8,2$	$99 \pm 7,9$	$69 \pm 4,6$
100 mM Na^+	$89 \pm 9,1$	$52 \pm 4,4$	$27 \pm 1,9$	$91 \pm 10,0$	$99 \pm 11,0$	$68 \pm 7,7$
<u>pH 7,5</u>						
ohne Na^+ , ohne RZ	$114 \pm 11,6$	$104 \pm 12,3$	$80 \pm 5,3$	$124 \pm 9,8$	$88 \pm 7,5$	$87 \pm 10,0$
100 mM Na^+	$161 \pm 14,1$	$153 \pm 15,6$	$87 \pm 3,9$	$126 \pm 8,4$	$73 \pm 6,7$	$53 \pm 6,3$
200 mM RZ	$177 \pm 5,4$	$160 \pm 9,8$	$108 \pm 6,1$	$143 \pm 5,1$	$104 \pm 2,8$	$89 \pm 3,5$

Temperaturabhängigkeit des Alkaliionentransports

Influx und Efflux von Alkaliionen erfolgen durch eine Lipidmembran, deren physikalischer Zustand von der Temperatur abhängt. Deshalb wurden die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen zwischen $0^\circ C$ und $55^\circ C$ bestimmt. Diese haben beim Wildtyp ein breites Temperaturoptimum zwischen $20^\circ C$ und $40^\circ C$. In diesem Temperaturbereich akkumuliert B 525 wesentlich weniger K^+ , Rb^+ und Cs^+ als B 163, verhält sich also typisch wie eine K^+ -Mangelmutante (Abb. 8). Man sieht jedoch, daß das Temperaturoptimum der Mutante deutlich in einen Bereich zwischen $10^\circ C$ und $20^\circ C$ verschoben ist, so daß schließlich bei Temperaturen unter $12^\circ C$ mehr K^+ , Rb^+ und Cs^+ angereichert wird als beim Wildtyp. Daneben erscheint bei $50^\circ C$ von K^+ über Rb^+ nach Cs^+ zunehmend ein zweites spitzes Temperaturoptimum. Die Mutante erreicht bei $50^\circ C$ die höchste intrazelluläre Cs^+ -Konzentration. Es erhebt sich nun die Frage, ob diese außerordentlich hohe Cs^+ -Anreicherung der Mutante bei dieser unphysiologischen Temperatur von $50^\circ C$ durch aktiven Transport zustande kommt. Wie in der Einleitung beschrieben, wird durch Entkoppler wie 2,4 DNP ein aktiver Transport stark eingeschränkt, weil diese als H^+ -Konduktoren zum Zusammenbruch des Membranpotentials führen. Tab. 2 zeigt eine erhebliche Verminderung der intrazellulären Cs^+ -Konzentration durch 2,4 DNP bei $50^\circ C$, d.h. die Akkumulation erfolgt bei dieser Temperatur tatsächlich durch aktiven Transport. Die intrazelluläre Cs^+ -Konzentration ist aber in Anwesenheit von $10^{-3} M$ DNP immer noch höher als die extrazelluläre. Dies mag auf einer unvollständigen Hemmung des Transports durch $10^{-3} M$ 2,4 DNP, auf intrazellulärer Bindung des Cs^+ oder auf einer DONNAN-Verteilung beruhen.



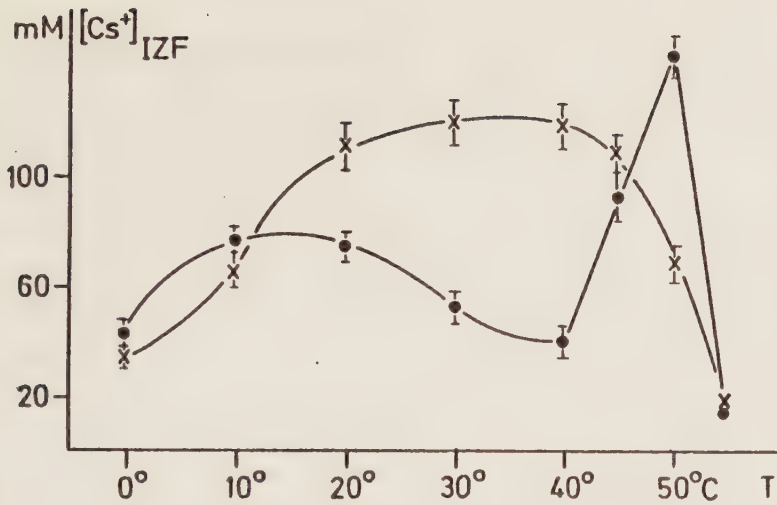


Abb. 8: Intrazelluläre K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration in Abhängigkeit von der Temperatur. Tris- PO_4 -Medium pH 7,5 x = B 163, • = B 525

Tab. 2: Wirkung von 2,4 DNP auf die intrazelluläre Cs^+ -Konzentration bei
pH 7,5 (mM/l)

	B 163		B 525	
	37° C	50° C	37° C	50° C
Kontrolle	$115 \pm 5,3$	$80 \pm 3,9$	$47 \pm 4,7$	$135 \pm 8,2$
10^{-3} mM 2,4 DNP	$33 \pm 1,5$	$28 \pm 0,8$	$21 \pm 0,6$	$30 \pm 1,3$

^{86}Rb - und ^{137}Cs -Fluxe

Die intrazellulären Gleichgewichtskonzentrationen ergeben sich aus Influx und Efflux. Zur Klärung der Frage, ob die Zunahme der intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen von B 525 im sauren pH-Bereich bzw. bei niedrigen Temperaturen und bei 50°C auf einer Zunahme des Influx und/oder auf einer Abnahme des Efflux beruhen, wurden die ^{86}Rb - und ^{137}Cs -Fluxe im Steady-state der Rb^+ - und Cs^+ -Verteilung ermittelt (Abb. 9, Tab. 3).

Beim Wildtyp nimmt die Geschwindigkeitskonstante für den ^{86}Rb -Efflux (Effluxkonstante) zwischen 0°C und 37°C nur minimal zu. Der Anstieg der intrazellulären Rb^+ -Konzentration zwischen 0°C und 20°C beruht auf einer steten Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten für den ^{86}Rb -Influx (Influxkonstante) in diesem Temperaturbereich. Zwischen 20°C und 37°C ändert sich auch die Influxkonstante nicht mehr wesentlich, was in dem breiten Temperaturoptimum der intrazellulären Konzentration von B 163 zum Ausdruck kommt. Steigt die Temperatur weiter auf 50°C an, so nimmt plötzlich die Effluxkonstante um den Faktor 4,5 zu. Dieser erhöhte ^{86}Rb -Efflux kann auch durch die gleichzeitige Zunahme der Influxkonstanten nicht ausgeglichen werden, und die intrazelluläre Konzentration beim Wildtyp nimmt ab.

Die Influxkonstante bei der Mutante verhält sich im wesentlichen Verlauf so wie die des Wildtyps. und zwar über den ganzen gemessenen Temperaturbereich von 0°C bis 50°C , sie ist aber immer um einen Faktor 2 größer. Dagegen zeigt die Effluxkonstante von B 525 gegenüber der von B 163 einen ganz anderen Verlauf. Während letztere von 0°C bis 37°C etwa konstant bleibt, steigt die Effluxkonstante von B 525 von 0°C bis 30°C steil und stetig an und verändert sich dann bis 50°C nur noch wenig (Abb.9). Bis etwa 20°C kann der Anstieg der Effluxkonstanten vom gleichzeitigen Anstieg der Influxkonstante ausgeglichen werden. Dies ist in gutem Einklang mit dem breiten Temperaturoptimum in diesem Bereich (vgl. Abb. 8). Dagegen ist bei 30°C und 37°C die Effluxkonstante gegenüber der Influxkonstanten stärker angestiegen und die intrazelluläre Konzentration nimmt ab. Bei 50°C führt der erneute Anstieg der Influxkonstanten bei gleichbleibender Effluxkonstanten zum 2. spitzen Temperaturoptimum.

Ein Vergleich der Fluxkonstanten bei pH 4,0 und 7,5 (Tab. 3) zeigt, daß die Efflux-

konstante für ^{86}Rb bei B 163 von pH 4,0 zu pH 7,5 nur geringfügig abnimmt. Der Anstieg der intrazellulären Konzentration mit dem pH beruht weitgehend auf einer Zunahme der Influxkonstanten. Bei der Mutante ist die Influxkonstante sowohl bei pH 4,0 als auch bei pH 7,5 wiederum um einen Faktor 2 größer als die des Wild-typs und ist bei pH 7,5 größer als bei pH 4,0. Dieser Anstieg reicht aber nicht aus, um die enorme Zunahme der Effluxkonstanten auszugleichen, daher resultiert bei pH 7,5 eine niedrigere intrazelluläre Rb^+ -Konzentration als bei pH 4,0 (vgl. Abb. 5). Die Fluxkonstanten für ^{137}Cs zeigen im wesentlichen dasselbe wie die für ^{86}Rb (Tab. 3). Sie sind aber kleiner und daher weniger deutlich.

Tab. 3: Geschwindigkeitskonstanten für den Influx (10^{-4} min^{-1}) und Efflux (10^{-2} min^{-1}) von ^{86}Rb und ^{137}Cs bei B 163 und B 525 im Steady-state der Rb^+ - und Cs^+ -Verteilung

	B 163		B 525	
	$k_{\text{infl.}}$	$k_{\text{effl.}}$	$k_{\text{infl.}}$	$k_{\text{effl.}}$
<u>^{86}Rb (37°C)</u>				
pH 4,0	3,5	2,2	7,6	5,0
pH 7,5	6,3	1,9	13,0	18,5
<u>^{137}Cs (37°C)</u>				
pH 4,0	1,3	2,3	2,7	2,9
pH 7,5	2,0	1,2	3,3	5,3
<u>^{137}Cs (pH 7,5)</u>				
37°C	2,0	1,2	3,3	5,3
50°C	2,4	3,4	7,1	5,5

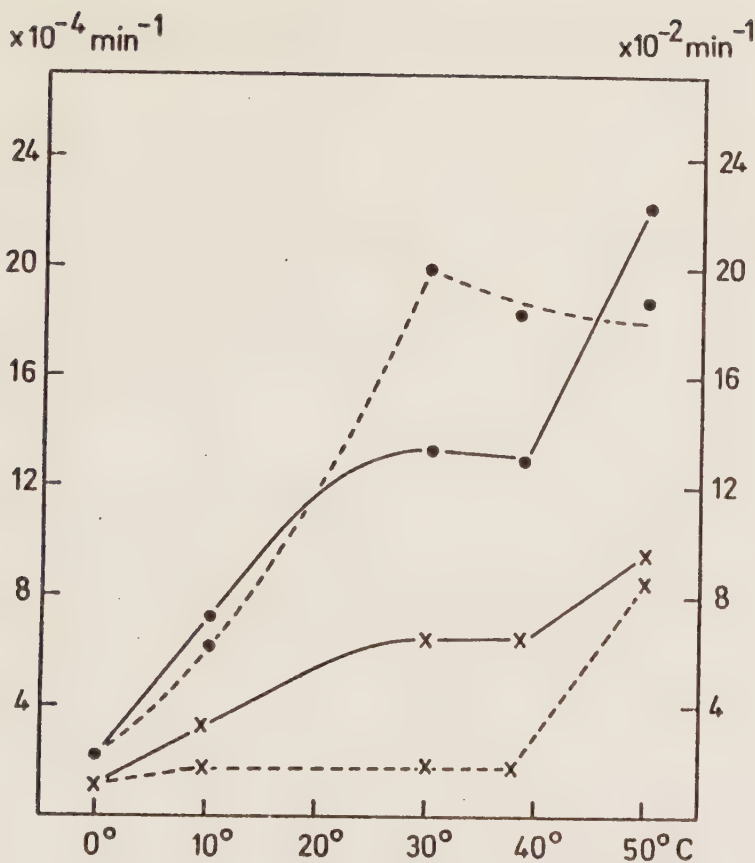


Abb. 9: Geschwindigkeitskonstanten für den ^{86}Rb -Influx (—) und den ^{86}Rb -Efflux (----) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Werte wurden nach SLAYMAN und TATUM (30) ermittelt. Links ist die Influx- und rechts die Effluxkonstante aufgetragen. x = B 163, • = B 525

Stoffwechsel

Zur Charakterisierung der Energiebereitstellung für den aktiven Transport wurden Atmung, aerobe und anaerobe Glykolyse unter den gleichen Bedingungen wie der K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Transport gemessen.

Obwohl B 525 bei einem pH von 4,0 mehr K^+ , Rb^+ und Cs^+ anreichert als B 163 nehmen Atmung und aerober Glucoseverbrauch zum sauren hin stärker ab als bei B 163 (Abb. 10). Der Transport erfolgt aber noch aktiv, denn Zugabe von 2,4 DNP hemmt die K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Akkumulation sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante (Tab. 4).

Die Energieversorgung bei 37° C und 50° C ist aus Abb. 10 und Tab. 5 ersichtlich. Während bei 37° C die Atmung bei Wildtyp und Mutante während des Versuchs nahezu konstant bleibt, sinkt der C_2 -Verbrauch bei 50° C bei beiden Stämmen schnell auf niedrige Werte ab, wobei die Mutante etwas hitzestabiler ist (Abb. 11). Im Gegensatz dazu bleibt der Glucoseverbrauch auch bei 50° C während der Versuchszeit bis 120 min nahezu konstant. Gemäß dem PASTEUR-Effekt mußte die starke Abnahme der Atmung bei 50° C zu einer Zunahme des Glucoseverbrauchs in der anaeroben Glykolyse führen, wodurch die Energieversorgung bei einem fakultativen Anaerobier wie E.coli gewährleistet ist. Tab. 5 zeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist. Auch die Regelung der Glykolyse ist noch vorhanden, denn die Zugabe von CN^- führt zu einer weiteren Erhöhung des Glucoseverbrauchs. Bei 50° C ist also bei B 163 und B 525 noch ein für den aktiven Transport ausreichender Energiestoffwechsel vorhanden.

Tab. 4: Wirkung von $3 \cdot 10^{-4}$ M 2,4 DNP auf die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen bei pH 4,0 (mM/l)

	B 163			B 525		
	K^+	Rb^+	Cs^+	K^+	Rb^+	Cs^+
ohne DNP	$95 \pm 6,3$	$48 \pm 5,5$	$23 \pm 3,7$	$92 \pm 8,4$	$101 \pm 7,1$	$60 \pm 4,2$
$3 \cdot 10^{-4}$ M DNP	$21 \pm 0,8$	$11 \pm 1,6$	$12 \pm 0,9$	$18 \pm 2,0$	$11 \pm 1,7$	$11 \pm 2,1$

Tab. 5: Aerober und anaerober (Zusatz von $3 \cdot 10^{-3}$ M NaCN) Glucoseverbrauch von E.coli B 163 und B 525 bei 37° C und 50° C. Tris PO_4 -Medium pH 7,5 mit je 10 mM K^+ , Rb^+ und Cs^+ . (μg Glucose/mg Protein·min)

	B 163			B 525		
	K^+	Rb^+	Cs^+	K^+	Rb^+	Cs^+
<u>a. NaCN</u>						
37° C	16,4	16,8	17,0	19,0	18,8	18,5
50° C	29,0	29,2	30,5	33,8	33,6	32,5
<u>+ NaCN</u>						
37° C	25,0		24,6	28,0		26,8
50° C	38,3		38,2	42,2		41,0

Da die Atmung bei 50° C stark eingeschränkt ist, und demzufolge die Energiebereitstellung für den aktiven Transport via Glykolyse ATP - ATPase erfolgt, verwundert es nicht, daß in Anwesenheit nicht glykolysierbarer Substrate die starke Cs^+ -Anreicherung unterbleibt (Tab. 6). Ebenso wenig erstaunt es, daß die von BUTLIN et al. isolierte Mg, Ca-ATPase- Mutante AN 120 (15) bei 50° C wesentlich weniger K^+ und Cs^+ anreichert als B 163 (Tab. 7). Dabei ist bei AN 120 die intrazelluläre K^+ - und Cs^+ -Konzentration immer noch höher als die extrazelluläre, was an einer noch vorhandenen geringen ATPase-Restaktivität oder einer geringen Restatmung liegen kann.

Wird die Atmung durch CN^- gehemmt, so tritt keine Beeinträchtigung des intrazellulären K^+ - und Rb^+ -Gehalts von B 163 und B 525 auf (Tab. 8). Dies ist in gutem Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen, daß nämlich bei einem Ausfall der Atmung über die Glykolyse ATP gebildet wird und via ATPase für den aktiven Transport zur Verfügung steht. Die ATPase-Mutante AN 120 ist unter solchen Bedingungen wiederum nicht in der Lage K^+ anzureichern (18). Da sich die ATPase von B 163 und B 525 nicht unterscheiden, ist es in diesem Zusammenhang interessant zu bemerken, daß der Unterschied zwischen B 163 und B 525 auch mit CN^- bestehen bleibt.

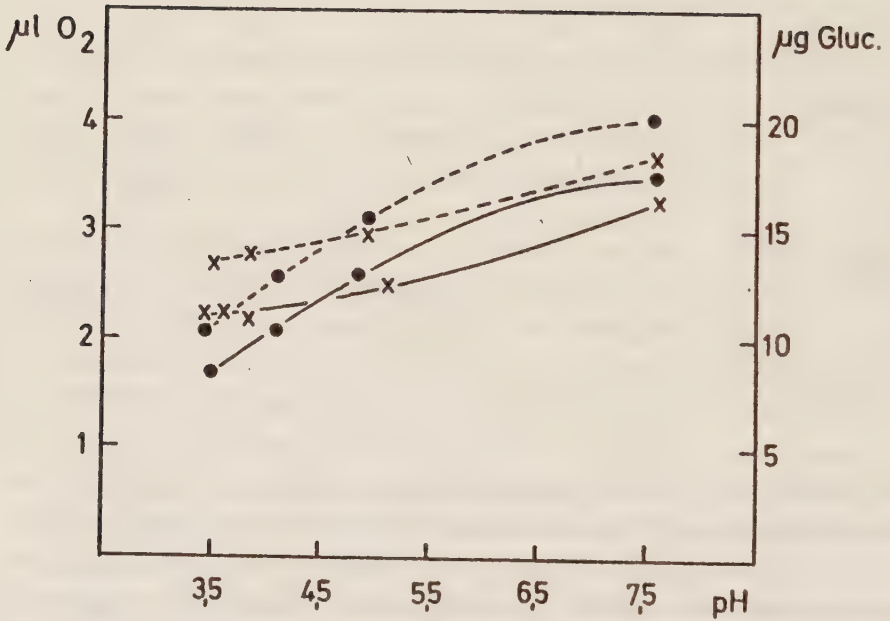


Abb. 10: Atmung (—) und aerober Glucoseverbrauch (----) bei B 163 (x) und B 525 (•) in Abhängigkeit vom pH.
Die Werte beziehen sich auf mg Protein · min

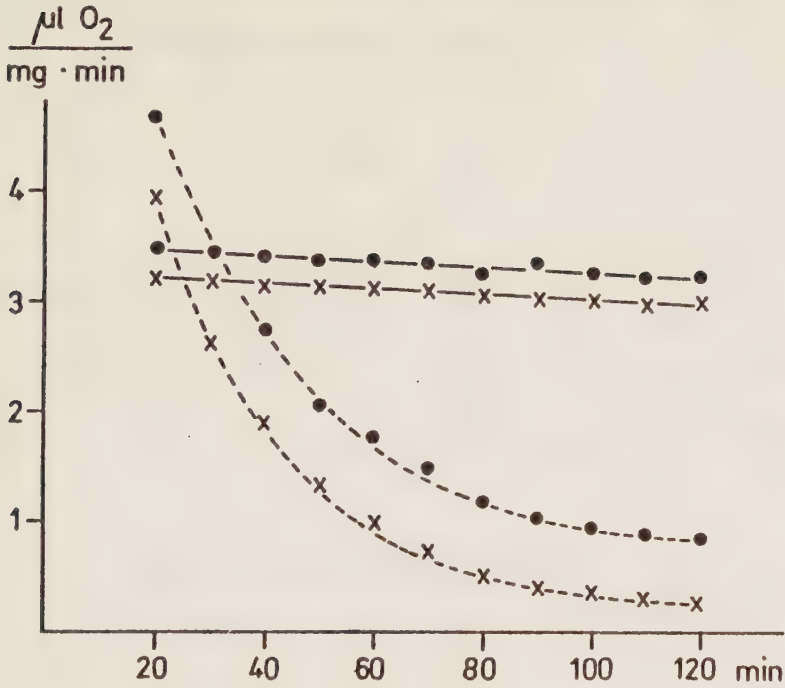


Abb. 11: Atmung von B 163 und B 525 in Abhängigkeit von der Versuchsdauer bei 37° C (—) und 50° C (----). x = B 163, • = B 525.
Tris PO₄-Medium pH 7,5

Tab. 6: Intrazelluläre Cs^+ -Konzentration (mM) in E.coli B 525 bei pH 7,5
in Gegenwart verschiedener Substrate. Die Substratkonzentration
betrug für Glucose und Glycerin jeweils 0,5 %, bei den anderen 30 mM

	37° C	50° C
Glucose	40,2	128,0
Glycerin	20,3	20,1
D-Laktat	31,3	27,5
β -Hydroxybutyrat	15,3	14,1
Succinat	23,9	24,5

Tab. 7: Intrazelluläre K^+ - und Cs^+ -Konzentration (mM) von E.coli B 163
und AN 120 bei pH 7,5

	B 163		AN 120	
	K^+	Cs^+	K^+	Cs^+
37° C	174	119	137	110
50° C	150	80	78	45

Tab. 8: Einfluß von 10^{-3} M NaCN auf die intrazelluläre K^{+} - und Rb^{+} -
Konzentration (mM) von B 163 und B 525 bei 37° C

		B 163		B 525	
		K^{+}	Rb^{+}	K^{+}	Rb^{+}
<u>pH 7,5</u>	ohne NaCN	$190 \pm 16,2$	$166 \pm 11,5$	141 ± 13	$59 \pm 4,5$
	+ NaCN	192 ± 14	$176 \pm 15,3$	$142 \pm 10,4$	$60 \pm 4,8$
<u>pH 4,0</u>	ohne NaCN	$85 \pm 9,0$	$44 \pm 5,6$	$72 \pm 6,7$	$102 \pm 12,1$
	+ NaCN	$82 \pm 7,9$	$44 \pm 3,9$	$80 \pm 7,1$	98 ± 8

Wachstum von E.coli B 163 und B 525

Wachstumsgeschwindigkeit und intrazelluläre K^+ -Konzentration von E.coli sind innerhalb eines bestimmten Bereichs proportional und korrelierbar. Dieser Bereich liegt zwischen einem Schwellenwert der intrazellulären K^+ -Konzentration von ca. 50 mM, bei dem das Wachstum beginnt, und einem Wert von ca. 150 mM, bei dem das maximale Wachstum erreicht ist (31). Weitere Erhöhung des intrazellulären K^+ -Gehalts führt dann nicht mehr zu einer Beschleunigung des Wachstums.

Bei pH 7,5 nimmt die Mutante bei niedriger extrazellulärer K^+ -Konzentration nicht genügend K^+ auf und ist daher nicht in der Lage zu wachsen. Mit zunehmender extrazellulärer Konzentration gleichen sich die Wachstumsgeschwindigkeiten von B 163 und B 525 bei diesem pH an (Abb. 12). Mit abnehmendem pH gleichen sich zwar die intrazellulären K^+ -Konzentrationen von B 163 und B 525 an und werden bei B 525 schließlich höher (vgl. Abb. 5), die Mutante wächst aber bei pH 4,5 auch bei hoher extrazellulärer Konzentration kaum noch. Offenbar ist B 525 im sauren nicht fähig, ein den Umständen entsprechendes, optimales Milieu im Zellinneren aufrecht zu erhalten.

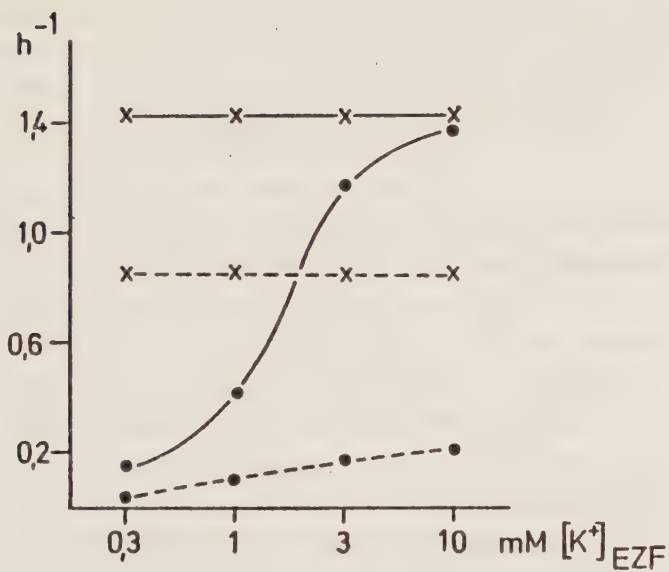


Abb. 12: Wachstum von *E. coli* B 163 (x) und B 525 (•) in Abhängigkeit von der extrazellulären K^+ -Konzentration bei pH 7,5 (—) und pH (----)

DISKUSSION

Die K^+ -Anreicherung in *E. coli* wird von 9 Genen genetisch determiniert (21). Eine solch große Zahl von Genen zeigt die Komplexität der K^+ -Anreicherung. Wenn ein am Transport beteiligtes Eiweißmolekül mutiert ist, so sind Auswirkungen auf andere am Transport beteiligte Faktoren zu erwarten, und es kann schwierig werden, primäre und sekundäre Veränderungen zu unterscheiden.

Die Frage, ob *E. coli* B 525 eine Influx- (Aufnahme-) oder eine Efflux- (Retentions-) mutante ist, kann mit Hilfe der Fluxkonstanten geklärt werden. Die Geschwindigkeitskonstante für den Influx ist bei der Mutante sogar größer als beim Wildtyp, und zwar immer um einen Faktor 2. Außerdem verhalten sich die beiden Influxkonstanten über den gesamten Temperaturbereich von 0°C bis 50°C und bei pH 4,0 bzw. 7,5 stets gleich; d.h., nimmt sie beim Wildtyp um einen bestimmten Faktor zu, so nimmt sie bei der Mutante um den gleichen Faktor zu. Diese Veränderung kann somit als ein Kompensationsversuch der Mutante gedeutet werden, eine möglichst hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration trotz eines massiv gesteigerten Effluxes aufrechtzuerhalten. Dagegen ist die Geschwindigkeitskonstante für den Efflux von B 525 erheblich größer als die von B 163 und zeigt auch ein völlig anderes Temperatur- und pH-Verhalten (Abb. 9, Tab. 3). Die Mutation hat offensichtlich nicht den Influx betroffen, B 525 ist also eine Retentionsmutante.

Es erhebt sich nun die Frage, wie es zu diesem übersteigerten Efflux von K^+ kommt. Es sollen 3 Möglichkeiten diskutiert werden:

1. Die passive Diffusion von K^+ (Rb^+ , Cs^+) aus der Zelle ist erhöht
2. Der Effluxcarrier für K^+ ist mutiert und transportiert K^+ (Rb^+ , Cs^+) vermehrt nach außen
3. Ein mutierter Na^+/H^+ -Antiporter wie er bei der *Strept. faec.*-Mutante 7683 postuliert wird (27, 28).

Die eigentliche Barriere gegen die freie Diffusion aller Ionen ist die Lipidschicht der Membran. Wenn die passive Diffusion von K^+ , Rb^+ und Cs^+ bei der Mutante erhöht wäre, so müßten Veränderungen in der Lipidschicht der Membran zu finden sein. Von TRÄUBLE (32) wurde ein Modell entwickelt, das die Permeation

kleiner Moleküle durch die Membran mittels "Kinks" erklärt. Kinks sind bewegliche Strukturhohlräume, die durch Rotation um $+120^\circ$ um eine C-C-Bindung in der Kohlenwasserstoffkette der Lipide und durch Gegenrotation um -120° um eine der nächsten beiden C-C-Bindungen der gleichen Kohlenwasserstoffkette entstehen (Abb. 13). Durch Distorsion und Verkürzung nimmt die Eigenenergie der einzelnen Kette zu, die deshalb möglichst schnell den gestreckten Zustand erreichen will. Dadurch wandert der "Kink" sehr schnell. Andererseits nimmt aber die Entropie in der Lipidschicht zu, so daß die Entstehung von "Kinks" begünstigt ist. In dem durch Kink-Bildung entstandenen, freien Volumen zwischen den Kohlenwasserstoffketten können kleine Moleküle quasi "per Anhalter" durch die Membran diffundieren (32). Fraglich ist allerdings, ob auch Alkaliionen mit ihrer großen Hydrathülle die Zelle auf diesem Wege verlassen können, da für die Bildung eines "Kink-Permeant-Komplexes" in diesem Fall wahrscheinlich eine zu hohe Aktivierungsenergie erforderlich wäre (33). Am ehesten könnte Cs^+ als das größte untersuchte Alkaliion die Zelle auf diesem Wege verlassen, da es an der Oberfläche die kleinste Ladungsdichte und damit die kleinste Hydrathülle und die größte Beweglichkeit besitzt. Die Effluxkonstanten für Cs^+ sind aber bei beiden E.coli-Stämmen wesentlich kleiner als die für Rb^+ (Abb. 9, Tab. 3). Auch der Einfluß von Na^+ und H^+ auf die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentrationen von B 525 im Gegensatz zu B 163 läßt sich durch passive Diffusion nicht erklären. Darüberhinaus findet sich kein Unterschied in der Phospholipidzusammensetzung der Membranen von B 163 und B 525 (34). Dies alles deutet darauf hin, daß der erhöhte Efflux der Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht durch passive Diffusion bedingt ist. Der physikalische Zustand der Membranlipide beeinflusst aber den K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Transport in beiden Richtungen, da ja auch die Carrier bzw. die Carrier-Kationen-Komplexe die Lipidschicht der Membran passieren müssen. Dieser Einfluß wird vor allem in der Abhängigkeit der intrazellulären K^+ -, Rb^+ und Cs^+ -Konzentrationen und der ^{137}Cs - bzw. ^{86}Rb -Fluxe von der Temperatur deutlich (Abb. 8, Abb. 9, Tab. 3). Mit steigender Temperatur scheint die Membran der Translokation der Alkaliionen immer weniger Widerstand entgegenzusetzen, was in der Zunahme aller Fluxkonstanten mit steigender Temperatur zum Ausdruck kommt.

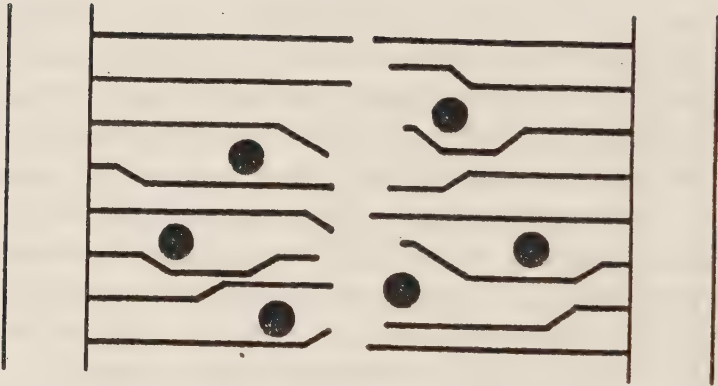


Abb. 13: Schematische Darstellung von Kinks in den Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide (nach TRÄUBLE, 32)

Wenn die passive Diffusion den erhöhten Efflux bei B 525 nicht erklärt, so denkt man nun an eine Mutation des von EPSTEIN und SCHULTZ (17) postulierten Effluxcarriers für K^+ . GÜNTHER und DORN haben schon 1966 angenommen, daß bei E.coli B 525 der Effluxcarrier für K^+ mutiert ist und vermehrt K^+ im Austausch gegen Na^+ unter neutralen Bedingungen aus der Zelle transportiert wird (8). Wenn Na^+ und K^+ (Rb^+ , Cs^+) an der Außenseite der Membran um den gleichen Site am Effluxcarrier konkurrieren, so ergibt sich daraus bei hoher extrazellulärer K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Konzentration eine hohe intrazelluläre Konzentration und damit normales Wachstum und Osmoregulation. Ist im Medium kein Na^+ vorhanden, so wird K^+ (Rb^+ , Cs^+) in erhöhtem Maße gegen sich selbst ausgetauscht und die intrazelluläre K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Konzentration ist höher als mit Na^+ (Abb. 7 a). Bei Überschuß von Na^+ wird extrazelluläres Na^+ gegen intrazelluläres K^+ ausgetauscht, und es ergibt sich eine extrem niedrige intrazelluläre K^+ -Konzentration.

Wenn bei niedrigem pH H^+ an der Außenseite mit dem Site des Effluxcarriers als Folge eines veränderten (mutierten) pK-Wertes reagieren würde, so könnte nun weniger Na^+ in die Zelle gelangen, was zu einer niedrigeren intrazellulären Na^+ -Konzentration führen würde (Abb. 7 b). Gleichzeitig würde nun weniger K^+ (Rb^+ , Cs^+) die Zelle verlassen können, was in einer Zunahme des intrazellulären K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Gehalts und der Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten für den Efflux zum Ausdruck kommt (Abb. 5, Abb. 7 a, Tab. 3).

Bei B 163 hat die extrazelluläre H^+ -Konzentration offenbar keinen Einfluß auf das Effluxcarriersystem. Unter sauren Bedingungen ist der Na^+ -Gehalt nicht verändert und der Efflux von K^+ , Rb^+ und Cs^+ bleibt konstant (Abb. 7 b, Tab. 3). Na^+ hat im Gegensatz zur Mutante nur den von EPSTEIN und SCHULTZ beschriebenen Effekt im Sinne der Osmoregulation (29).

Wenn im sauren bei B 525 mehr H^+ -Ionen über den mutierten Effluxcarrier nach innen gelangen und über den K^+/H^+ -Antiporter (Influxcarrier) nicht mehr nach außen gelangen können, so folgt daraus ein erniedrigter intrazellulärer pH, was zu einer Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels (Abb.10) und vor allem des Wachstums (Abb. 12) führt. Hierfür sprechen auch Ergebnisse mit Ethacrynsäure.

Diese schwache Säure kann die Zellmembran permeieren und wird bei niedrigem intrazellulären pH vermehrt angereichert. *E. coli* B 525 bindet etwa 10 x mehr Ethacrynsäure als B 163 (16). Allerdings wird bei niedrigem extrazellulären pH auch der K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Influx gehemmt. Dieser Effekt ist aber bei Wildtyp und Mutante gleich (Tab. 3) und wurde schon von ARMSTRONG und ROTHSTEIN beschrieben und ausführlich diskutiert (24, 25).

Von HAROLD et al. (27, 28) wurde eine *Strept. faec.*-Mutante 7683 beschrieben, die der *E. coli*-Mutante B 525 ähnelt. In Anwesenheit von Na^+ gibt diese Mutante bei pH 7,5 im Gegensatz zu ihrem Wildtyp K^+ sehr schnell an die Umgebung ab. Im Säuren ist die K^+ -Retention dagegen besser. Die K^+ -Aufnahme bei 7683 ist nicht gestört. Alle diese Eigenschaften finden sich auch bei *E. coli* B 525. Zunächst wurde angenommen, daß bei 7683 die Na^+ -Ausscheidung defekt ist (27), später wurde sie als Mutante des Na^+/H^+ -Antiports erkannt (28).

Es erhebt sich nun die Frage, ob auch bei B 525 der Na^+/H^+ -Antiporter mutiert ist, da WEST und MITCHELL (35) auch für *E. coli* die Existenz eines Na^+/H^+ -Antiports nachweisen konnten. Wenn der Na^+/H^+ -Antiporter defekt wäre, so könnte einmal in die Zelle aufgenommenes Na^+ die Zelle nicht mehr verlassen und es könnte kein K^+ in der Zelle angereichert werden, was zum Sistieren des Wachstums führen mußte. Dies trifft zwar für *Strept. faec.* 7683, nicht aber für *E. coli* B 525 zu. Bei letzterem wird durch Na^+ der intrazelluläre K^+ -Gehalt zwar erniedrigt (Abb. 7a), jedoch kann B 525 in Gegenwart von Na^+ immer noch aktiv K^+ akkumulieren. Auch das Wachstum ist in Anwesenheit von Na^+ verlangsamt, die Wachstumsgeschwindigkeit gleicht sich aber schon bei wesentlich niedrigeren K^+ -Konzentrationen als bei 7683 an die des Wildtyps in Anwesenheit von Na^+ an. Ein anderer wesentlicher Unterschied ist die Tatsache, daß B 525 im sauren so gut wie überhaupt nicht wächst (Abb. 12), während 7683 immerhin die halbe Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps im sauren erreicht (27). Somit scheinen B 525 und 7683 trotz vieler Gemeinsamkeiten (vor allem der erhöhte K^+ -Efflux) verschiedene Mutationen zu sein. Man muß aber bedenken, daß auch der K^+ -Efflux durch zwei Gene, nämlich TrK B und TrK C, determiniert ist (21, 36). Die K^+ -Retention könnte also durch verschiedene Mutationen beeinträchtigt werden. *E. coli* B 525 weist eine Mutation in der Nähe des Leucin-

Markers auf. Diese Stelle ist wahrscheinlich mit dem ebenfalls dort liegenden TrK C identisch. Man kann daher annehmen, daß ein mutiertes TrK C-Gen phänotypisch einen mutierten Effluxcarrier für K^+ zur Folge hätte, ein mutiertes TrK B-Gen dagegen einen Defekt im Na^+/H^+ -Antiport.

Es wäre aber auch möglich, daß der Effluxcarrier für K^+ mit dem Na^+/H^+ -Antiporter identisch ist, wobei der Unterschied zwischen *E. coli* B 525 und *Strept. faec.* 7683 lediglich quantitativer Art wäre. Durch Mutation könnte hierbei die Affinität des Na^+/H^+ -Antiporters für K^+ angestiegen sein und somit vermehrt K^+ (Rb^+ , Cs^+) anstelle des Na^+ aus der Zelle transportieren (37). Die wichtige Funktion des Na^+/H^+ -Antiporters beim Abbau des pH-Gradienten unter Erhaltung des Membranpotentials wurde in der Einleitung erörtert, und es wurde darauf hingewiesen, wie wichtig diese Funktion für den ungestörten Ablauf des Energiestoffwechsels ist. Wenn nun die Affinität des Na^+/H^+ -Antiporters für K^+ größer geworden ist, so muß das zu einen gesteigerten Efflux für K^+ (Rb^+ , Cs^+) führen, wie dies bei B 525 tatsächlich beobachtet wird.

ZIMMERMANN et al. fanden, daß durch die Zugabe von Leucin und Histidin zum Inkubationsmedium ein Absinken des intrazellulären K^+ -Gehalts in Langzeitversuchen vermieden wird, wobei diese Aminosäuren in der Zelle angereichert werden (38, 39). Dies könnte man wie folgt erklären: Leucin und Histidin gelangen über einen Anionen/ H^+ -Symporter zusammen mit H^+ in die Zelle. Dadurch wird der Na^+/H^+ -Antiporter in seiner Funktion, den pH-Gradienten abzubauen, entlastet. Dies führt bei B 525, dessen Na^+/H^+ -Antiporter vermehrt K^+ nach außen transportieren soll, zu einer besseren K^+ -Retention. Nicht geklärt ist jedoch hierbei, warum stöchiometrisch mehr K^+ retiniert wird als ^{14}C -markierte Aminosäuren aufgenommen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die intrazellulären K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Gleichgewichtskonzentrationen, die ^{86}Rb - und ^{137}Cs -Fluxe sowie Atmung, Glucoseverbrauch und Wachstum in Abhängigkeit von Temperatur, pH, extrazellulärer K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ -Konzentration, Osmolarität und in Anwesenheit verschiedener Substrate bzw. Inhibitoren untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei E.coli B 525 der Efflux von K^+ -, Rb^+ - und Cs^+ durch Mutation stark erhöht ist. E.coli B 525 ist also eine Retentionsmutante.

Zur Erklärung des gesteigerten Effluxes wurden drei Modelle diskutiert:

Eine erhöhte passive Diffusion aus der Zelle.

Ein mutierter Effluxcarrier für K^+ .

Ein mutierter Na^+/H^+ -Antiporter.

Die erhöhte passive Diffusion ließ sich ausschließen.

Ein mutierter Effluxcarrier würde bei neutralem pH vermehrt intrazelluläres K^+ gegen extrazelluläres Na^+ austauschen. Bei hoher extrazellulärer K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Konzentration wird Na^+ in zunehmendem Maße an der Außenseite durch K^+ vom Carriersite verdrängt, wodurch es zu einer besseren K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Akkumulation kommt. Bei niedrigem extrazellulärem pH reagiert H^+ mit dem mutierten Effluxcarrier, wodurch der Einfluß des Na^+ auf die intrazelluläre K^+ (Rb^+ , Cs^+)-Konzentration aufgehoben wird. Gleichzeitig kommt es dadurch zu einer vermehrten Aufnahme von H^+ in die Zelle, wodurch es im Zellinneren zu einer Übersäuerung und damit zu einer Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels und des Wachstums kommt. Der Effluxcarrier des Wildtyps wird dagegen durch Na^+ und H^+ nicht beeinflusst.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß der Effluxcarrier für K^+ mit dem Na^+/H^+ -Antiporter identisch ist, wobei dieser bei der Mutante eine höhere Affinität für K^+ bekommen hat und nun vermehrt K^+ nach außen transportiert.

LITERATUR

1. L. Eichelberger, E.S. Fetcher, E.M.K. Geiling, B.J. Vos jr.:
Distribution of Water and Electrolytes in The Blood of Dolphins.
J. Biol. Chem. 133, 145 (1940)
2. S.E. Kerr: Studies of the Anorganic Composition of Blood.
J. Biol. Chem. 177, 227 (1937)
3. D.C. Tosteson: Active Transport Genetics and Cellular Evolution.
Fed. Proc. 22, 19 (1963)
4. J.C. Skou: Enzymatic Basis for Active Transport of Na^+ and K^+
Across Cell Membranes.
Physiol. Rev. 45, 596 (1965)
5. P.C. Chan, V. Calabrese, L.S. Theil: Species Differences in the Effect
of Sodium and Potassium Ions on the ATPase of Erythrocyte
Membranes.
Biochim. Biophys. Acta 79, 424 (1964)
6. J.L. Dahl, L.E. Hokin: The Sodium Potassium Adenosin Triphosphatase.
Ann. Rev. Biochem. 43, 327 (1974)
7. T. Günther, F. Dorn: Über die ATPase von E.coli B 163 und seiner
 K^+ -Mangelmutante B 525.
Z. Naturf. 21b, 1076 (1966 a)
8. T. Günther, F. Dorn: Über den K^+ -Transport bei der K^+ -Mangelmutante B 525.
Z. Naturf. 21 b, 1082 (1966 b)
9. R. Averdunk, T. Günther, F. Dorn, U. Zimmermann: Über die Wirkung von
Antikörpern auf die ATPase - Aktivität und den aktiven Na^+ - K^+ -
Transport von E.coli und Menschenerythrozyten.
Z. Naturf. 24 b, 693 (1969)
10. G. van Thienen, P.W. Postma: Coupling Between Energy Conservation and
Active Transport of Serin in Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 323, 429 (1973)
11. W.L. Klein, P.D. Boyer: Energization of Active Transport in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 247, 7257 (1972)
12. E.A. Liberman, V.P. Skulachev: Conversion of Biomembrane Produced
Energy into Electric Form. IV. General Discussion.
Biochim. Biophys. Acta 216, 30 (1970)
13. P. Mitchell: Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic
Phosphorylation.
Biol. Rev. 41, 445 (1966)
14. O.H. LeBlanc: The Effect of Uncouplers of Oxidative Phosphorylation
on Lipid Bilayer Membranes.
J. Membr. Biol. 4, 227 (1971)

15. J.D. Butlin, G.B. Cox, F. Gibson: Oxidative Phosphorylation in *E.coli* K 12. Mutations Affecting Magnesium or Calcium Ion Stimulated Adenosin Triphosphatase.
Biochem. J. 124, 75 (1971)
16. T. Günther, F. Dorn, M.R. Haug, W. Pellnitz: Inhibition of K^+ -Transport and Metabolism of *Escherichia coli* by Ethacrynic Acid.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, 97 (1974)
17. C.W. Slayman: Net Potassium Transport in *Neurospora*. Properties of a Transport Mutant.
Biochim. Biophys. Acta 211, 502 (1970)
18. R. Damadian: Ion Metabolism in a Potassium Accumulation Mutant of *Escherichia coli* B.
J. Bacteriol. 95, 113 (1968)
19. C.W. Slayman, E.L. Tatum: Potassium Transport in *Neurospora*: III. Isolation of a Transport Mutant.
Biochim. Biophys. Acta 109, 184 (1965)
20. B. Lubochimsky, J. Meury, J. Stolkowski: Cinétique des échanges de potassium chez l'*Escherichia coli* souche B 207, qui ne peut croître qu'en présence de concentrations élevées en potassium.
C.R. Acad. Sci., Paris 258, 5106 (1965)
21. W. Epstein, B.S. Kim: Potassium Transport Loci in *Escherichia coli* K 12.
J. Bacteriol. 108, 639 (1971)
22. W. Epstein, M. Davies: Potassium dependant Mutants of *Escherichia coli* K 12.
J. Bacteriol. 101, 836 (1970)
23. M. Lubin, D. Kessel: Preliminary Mapping of the Genetic Locus for Potassium Transport in *Escherichia coli*.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 2, 249 (1960)
24. W. McD. Armstrong, A. Rothstein: Discrimination between Alkali Metal Ions by Yeast I. Effect of pH on Uptake.
J. Gen. Physiol. 48, 61 (1964)
25. W. McD. Armstrong, A. Rothstein: Discrimination between Alkali Metal Ions by Yeast II. Cation Interactions in Transport.
J. Gen. Physiol. 50, 967 (1967)
26. F.M. Harold, R.L. Harold, J.R. Baarda, A. Abrams: A Genetic Defect in Retention of Potassium by *Streptococcus faecalis*.
Biochem. 6, 177 (1967)
27. F.M. Harold, D. Papineau: Cation Transport and Electrogenesis by *Streptococcus faecalis*. II. Proton and Sodium Extrusion.
J. Membr. Biol. 8, 45 (1972)

28. F.M. Harold, J.R. Baarda, E. Paslova: Extrusion of Sodium and Hydrogen Ions as the Primary Process in The Potassium Ion Accumulation by *Streptococcus Faecalis*.
J. Bacteriol. 101, 152 (1970)
29. W. Epstein, S.G. Schultz: Cation Transport in *Escherichia coli*.
V. Regulation of the Cation Transport.
J. Gen. Physiol. 49, 221 (1965)
30. C.W. Slayman, E.L. Tatum: Potassium Transport in *Neurospora*.
II. Measurement of the Steady State Fluxes.
Biochim. Biophys. Acta 102, 149 (1965)
31. T. Günther, unveröffentlichte Versuche
32. H. Trüuble: The Movement of Molecules Across Lipid Membranes.
A Molecular Theory.
J. Membr. Biol. 4, 193 (1971)
33. H. Trüuble, persönliche Mitteilung
34. B. Lubochinsky, J. Meury, J. Stolkowski: Transport du potassium et synthese des phospholipides chez l'*Escherichia coli*. I. Les Phospholipides des Souches B 163 et B 525.
Soc. Chim. Biol. 1529 (1965)
35. I.C. West, P. Mitchell: Proton/Sodium Antiport in *Escherichia coli*.
Biochem. J. 144, 87 (1974)
36. D.B. Rhoads, F.B. Waters, W. Epstein: (Cation Transport in *Escherichia coli*.
VIII. Potassium Transport Mutants)
im Druck
37. T. Günther, persönliche Mitteilung
38. U. Zimmermann, G. Pilwat: Einfluß von Ammoniumchlorid und der essentiellen Aminosäuren Histidin und Leucin auf die stationäre Kaliumverteilung in *E.coli* B 525.
Z. Naturf. 26 b, 887 (1971)
39. U. Zimmermann, G. Pilwat, T. Günther: Regulation of the Intracellular Potassium Concentration in *Escherichia coli* B 525.
Biochim. Biophys. Acta 311, 442 (1973)
40. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. L. Farr, R.J. Randall: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

Ich danke Herrn Professor Dr. Theodor Günther für die Überlassung des Themas sowie für wertvolle Hinweise bei der Interpretation der Versuchsergebnisse. Bei Herrn Dr. Friedbert Dorn möchte ich mich an dieser Stelle für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils recht herzlich bedanken. Mein Dank gilt nicht zuletzt Frau Elfriede Weber für das Schreiben der Arbeit.

Lebenslauf

Am 28.9.1946 wurde ich als Tochter des Geschäftsführers der Gewerbe- und Landwirtschaftsbank Hindelang Martin Haug und seiner Frau Gertrud, geb. Winzeck, in Stuttgart geboren.

Vom September 1953 bis zum Juli 1958 besuchte ich die Volksschule Hindelang.

Mit Beginn des Schuljahres 1958 wechselte ich zum Gymnasium Oberstdorf über, wo ich im Juli 1967 das Abitur ablegte.

Ich begann das Studium der Human-Medizin am 1. Oktober 1967 an der Freien Universität Berlin. Die ärztliche Prüfung vollendete ich am 20.2.1974 und bestand im Anschluß daran das amerikanische Staatsexamen für Medizin (ECFMG) am 24. Juli 1974.

Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich vom 1. Dezember 1974 bis zum 30. November 1975 in Berlin. Seit dem 1. Dezember 1975 arbeite ich als wissenschaftliche Assistentin im Isotopenforschungslabor der Strahlenklinik und Poliklinik im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin.

Dissertationsdruck Fred Höpfner
Pestalozzistr. 106 (Ecke Heibtreustra.) 1 Berlin 12



312 88 85
313 81 98